HAL
open science

Origine mitochondriale de certaines formes de sclérose latérale amyotrophique : caractérisation fonctionnelle de CHCHD10 et implication clinique

Morgane Plutino

To cite this version:

Morgane Plutino. Origine mitochondriale de certaines formes de sclérose latérale amyotrophique : caractérisation fonctionnelle de CHCHD10 et implication clinique. Médecine humaine et pathologie. 2015. dumas-01333940

HAL Id: dumas-01333940

https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01333940v1

Submitted on 20 Jun 2016

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITE DE NICE SOPHIA ANTIPOLIS
FACULTE DE MEDECINE DE NICE

ORIGINE MITOCHONDRIALE DE CERTAINES FORMES DE SCLEROSE LATERALE AMYOTROPHIQUE : CARACTERISATION FONCTIONNELLE DE CHCHD10 ET IMPLICATION CLINIQUE

THESE

Présentée et publiquement soutenue devant la faculté de médecine de Nice

Le 15 septembre 2015

Par

Morgane Plutino
Née le 21 novembre 1985 à Cannes

INTERNE DES HOPITAUX

Pour obtenir le grade de Docteur en médecine
(Diplôme d'état)

Examinateurs de la thèse:

Madame le Professeur Valérie GIORDANENGO	Président du jury
Madame le Professeur Sabrina SACCONI	Assesseur
Madame le Docteur Annabelle CHAUSSENOT	Assesseur
Madame le Professeur Véronique PAQUIS-FLUCKLINGER	Directrice de thèse

UNIVERSITÉ DE NICE-SOPHIA ANTIPOLIS

FACULTÉ DE MÉDECINE

Liste des professeurs au **1er décembre 2014** à la Faculté de Médecine de Nice

Doyen	M. BAQUÉ Patrick
Vice-Doyen	M. BOILEAU Pascal
Assesseurs	M. ESNAULT Vincent M. CARLES Michel Mme BREUIL Véronique M. MARTY Pierre
Conservateur de la bibliothèque	Mme DE LEMOS Annelyse
Directrice administrative des services	Mme CALLEA Isabelle
Doyens Honoraires	M. AYRAUD Noël M. RAMPAL Patrick M. BENCHIMOL Daniel

Professeurs Honoraires

M. BALAS Daniel
M. BLAIVE Bruno
M. BOQUET Patrice
M. BOURGEON André
M. BOUTTÉ Patrick
M. BRUNETON Jean-Noël
Mme BUSSIERE Françoise
M. CAMOUS Jean-Pierre
M. CHATEL Marcel
M. COUSSEMENT Alain
M. DARCOURT Guy
M. DELLAMONICA Pierre
M. DELMONT Jean
M. DEMARD François
M. DOLISI Claude
M . FRANCO Alain
M. FREYCHET Pierre
M. GÉRARD Jean-Pierre
M. GILLET Jean-Yves
M. GRELLIER Patrick
M. HARTER Michel
M. INGLESAKIS Jean-André
M. LALANNE Claude-Michel
M. LAMBERT Jean-Claude
M. LAZDUNSKI Michel
M. LEFEBVRE Jean-Claude
M. LE BAS Pierre
M. LE FICHOUX Yves
M. LOUBIERE Robert
M. MARIANI Roger
M. MASSEYEFF René
M. MATTEI Mathieu
M. MOUIEL Jean
Mme MYQUEL Martine
M. OLLIER Amédée
M. ORTONNE Jean-Paul
M. SCHNEIDER Maurice
M. SERRES Jean-Jacques
M. TOUBOL Jacques
M. TRAN Dinh Khiem
M. ZIEGLER Gérard

M.C.A. Honoraire	Mlle ALLINE Madeleine
M.C.U. Honoraires	M. ARNOLD Jacques M. BASTERIS Bernard Mlle CHICHMANIAN Rose-Marie Mme DONZEAU Michèle M. EMILIOZZI Roméo M. FRANKEN Philippe M. GASTAUD Marcel M.GIRARD-PIPAU Fernand M. GIUDICELLI Jean M. MAGNÉ Jacques Mme MEMRAN Nadine M. MENGUAL Raymond M. POIRÉE Jean-Claude Mme ROURE Marie-Claire

PROFESSEURS CLASSE EXCEPTIONNELLE

M.	AMIEL Jean	Urologie (52.04)
M.	BENCHIMOL Daniel	Chirurgie Générale (53.02)
M.	BOILEAU Pascal	Chirurgie Orthopédique et Traumatologique (50.02)
M.	DARCOURT Jacques	Biophysique et Médecine Nucléaire (43.01)
M.	DESNUELLE Claude	Biologie Cellulaire (44.03)
Mme	EULLER-ZIEGLER Liana	Rhumatologie (50.01)
M.	FENICHEL Patrick	Biologie du Développement et de la Reproduction (54.05)
M.	FUZIBET Jean-Gabriel	Médecine Interne (53.01)
M.	GASTAUD Pierre	Ophtalmologie (55.02)
M.	GILSON Éric	Biologie Cellulaire (44.03)
M.	GRIMAUD Dominique	Anesthésiologie et Réanimation Chirurgicale (48.01)
M.	HASSEN KHODJA Reda	Chirurgie Vasculaire (51.04)
M.	HÉBUTERNE Xavier	Nutrition (44.04)
M.	HOFMAN Paul	Anatomie et Cytologie Pathologiques (42.03)
M.	LACOUR Jean-Philippe	Dermato-Vénéréologie (50.03)
Mme	LEBRETON Élisabeth	Chirurgie Plastique, Reconstructrice et Esthétique (50.04)
M.	MICHIELS Jean-François	Anatomie et Cytologie Pathologiques (42.03)
M.	MOUROUX Jérôme	Chirurgie Thoracique et Cardiovasculaire (51.03)
M.	PAQUIS Philippe	Neurochirurgie (49.02)
M.	PRINGUEY Dominique	Psychiatrie d'Adultes (49.03)
M.	QUATREHOMME Gérald	Médecine Légale et Droit de la Santé (46.03)
M.	M.ROBERT Philippe	Psychiatrie d'Adultes (49.03)
M.	SANTINI Joseph	O.R.L. (55.01)
M.	THYSS Antoine	Cancérologie, Radiothérapie (47.02)
M.	VAN OBBERGHEN Emmanuel	Biochimie et Biologie Moléculaire (44.01)

PROFESSEURS PREMIERE CLASSE

M.	BAQUÉ Patrick	Anatomie - Chirurgie Générale (42.01)
M.	BATT Michel	Chirurgie Vasculaire (51.04)
M.	BÉRARD Étienne	Pédiatrie (54.01)
M.	BERNARDIN Gilles	Réanimation Médicale (48.02)
M.	BONGAIN André	Gynécologie-Obstétrique (54.03)
M.	CASTILLO Laurent	O.R.L. (55.01)
Mme	CRENESSE Dominique	Physiologie (44.02)

M.	DE PERETTI Fernand	Anatomie-Chirurgie Orthopédique (42.01)
M.	DRICI Milou-Daniel	Pharmacologie Clinique (48.03)
M.	ESNAULT Vincent	Néphrologie (52-03)
M.	FERRARI Émile	Cardiologie (51.02)
M.	GIBELIN Pierre	Cardiologie (51.02)
M.	GUGENHEIM Jean	Chirurgie Digestive (52.02)
Mme	ICHAI Carole	Anesthésiologie et Réanimation Chirurgicale (48.01)
M.	LONJON Michel	Neurochirurgie (49.02)
M.	MARQUETTE Charles-Hugo	Pneumologie (51.01)
M.	MARTY Pierre	Parasitologie et Mycologie (45.02)
M.	MOUNIER Nicolas	Cancérologie, Radiothérapie (47.02)
M.	PADOVANI Bernard	Radiologie et Imagerie Médicale (43.02)
Mme	PAQUIS Véronique	Génétique (47.04)
M.	RAUCOULES-AIMÉ Marc	Anesthésie et Réanimation Chirurgicale (48.01)
Mme	RAYNAUD Dominique	Hématologie (47.01)
M.	ROSENTHAL Éric	Médecine Interne (53.01)
M.	SCHNEIDER Stéphane	Nutrition (44.04)
M.	THOMAS Pierre	Neurologie (49.01)
M.	TRAN Albert	Hépato Gastro-entérologie (52.01)

PROFESSEURS DEUXIEME CLASSE

M.	ALBERTINI Marc	Pédiatrie (54.01)
Mme	ASKENAZY-GITTARD Florence	Pédopsychiatrie (49.04)
M.	BAHADORAN Philippe	Cytologie et Histologie (42.02)
M.	BARRANGER Emmanuel	Gynécologie Obstétrique (54.03)
M.	BENIZRI Emmanuel	Chirurgie Générale (53.02)
Mme	BLANC-PEDEUTOUR Florence	Cancérologie – Génétique (47.02)
M.	BREAUD Jean	Chirurgie Infantile (54-02)
Mlle	BREUIL Véronique	Rhumatologie (50.01)
M.	CANIVET Bertrand	Médecine Interne (53.01)
M.	CARLES Michel	Anesthésiologie Réanimation (48.01)
M.	CASSUTO Jill-Patrice	Hématologie et Transfusion (47.01)
M.	CHEVALLIER Patrick	Radiologie et Imagerie Médicale (43.02)
Mme	CHINETTI Giulia	Biochimie-Biologie Moléculaire (44.01)
M.	DUMONTIER Christian	Chirurgie plastique
M.	FERRERO Jean-Marc	Cancérologie ; Radiothérapie (47.02)
M.	FONTAINE Denys	Neurochirurgie (49.02)
M.	FOURNIER Jean-Paul	Thérapeutique (48-04)
M.	FREDENRICH Alexandre	Endocrinologie, Diabète et Maladies métaboliques (54.04)
Mlle	GIORDANENGO Valérie	Bactériologie-Virologie (45.01)
M.	GUÉRIN Olivier	Gériatrie (48.04)
M.	HANNOUN-LEVI Jean-Michel	Cancérologie ; Radiothérapie (47.02)
M.	IANNELLI Antonio	Chirurgie Digestive (52.02)
M.	JOURDAN Jacques	Chirurgie Thoracique et Cardiovasculaire (51.03)
M.	LEVRAUT Jacques	Anesthésiologie et Réanimation Chirurgicale (48.01)
M.	PASSERON Thierry	Dermato-Vénéréologie (50-03)
M.	PICHE Thierry	Gastro-entérologie (52.01)
M.	PRADIER Christian	Épidémiologie, Économie de la Santé et Prévention (46.01)
M.	ROGER Pierre-Marie	Maladies Infectieuses ; Maladies Tropicales (45.03)
M.	ROHRLICH Pierre	Pédiatrie (54.01)
M.	RUIMY Raymond	Bactériologie-virologie (45.01)
Mme	SACCONI Sabrina	Neurologie (49.01)
M.	SADOUL Jean-Louis	Endocrinologie, Diabète et Maladies Métaboliques (54.04)

M.	STACCINI Pascal	Biostatistiques et Informatique Médicale (46.04)
M.	TROJANI Christophe	Chirurgie Orthopédique et Traumatologique (50.02)
M.	VENISSAC Nicolas	Chirurgie Thoracique et Cardiovasculaire (51.03)

PROFESSEUR DES UNIVERSITÉS

M.	SAUTRON Jean-Baptiste	Médecine Générale

MAITRES DE CONFÉRENCES DES UNIVERSITÉS - PRATICIENS HOSPITALIERS

Mme	ALUNNI Véronique	Médecine Légale et Droit de la Santé (46.03)
M.	AMBROSETTI Damien	Cytologie et Histologie (42.02)
Mme	BANNWARTH Sylvie	Génétique (47.04)
M.	BENOLIEL José	Biophysique et Médecine Nucléaire (43.01)
Mme	BERNARD-POMIER Ghislaine	Immunologie (47.03)
Mme	BUREL-VANDENBOS Fanny	Anatomie et Cytologie pathologiques (42.03)
M.	DELOTTE Jérôme	Gynécologie-Obstétrique (54.03)
M.	DOGLIO Alain	Bactériologie-Virologie (45.01)
M.	FOSSE Thierry	Bactériologie-Virologie-Hygiène (45.01)
M.	GARRAFFO Rodolphe	Pharmacologie Fondamentale (48.03)
Mme	GIOVANNINI-CHAMI Lisa	Pédiatrie (54.01)
Mme	HINAULT Charlotte	Biochimie et biologie moléculaire (44.01)
Mlle	LANDRAUD Luce	Bactériologie–Virologie (45.01)
Mme	LEGROS Laurence	Hématologie et Transfusion (47.01)
Mme	MAGNIÉ Marie-Noëlle	Physiologie (44.02)
Mme	MOCERI Pamela	Cardiologie (51.02)
Mme	MUSSO-LASSALLE Sandra	Anatomie et Cytologie pathologiques (42.03)
M.	NAÏMI Mourad	Biochimie et Biologie moléculaire (44.01)
M.	PHILIP Patrick	Cytologie et Histologie (42.02)
Mme	POMARES Christelle	Parasitologie et mycologie (45.02)
M.	ROUX Christian	Rhumatologie (50.01)
M.	TESTA Jean	Épidémiologie Économie de la Santé et Prévention (46.01)
M.	TOULON Pierre	Hématologie et Transfusion (47.01)

PROFESSEURS ASSOCIÉS

M.	HOFLIGER Philippe	Médecine Générale
Mme	POURRAT Isabelle	Médecine Générale
M.	PRENTKI Marc	Biochimie et Biologie moléculaire

MAITRES DE CONFÉRENCES ASSOCIÉS

Mme	CHATTI Kaouthar	Biophysique et Médecine Nucléaire
M.	DARMON David	Médecine Générale
MI.	GARDON Gilles	Médecine Générale
Mme	MONNIER Brigitte	Médecine Générale
M.	PAPA Michel	Médecine Générale

PROFESSEURS CONVENTIONNÉS DE L'UNIVERSITÉ

M.	BERTRAND François	Médecine Interne
M.	BROCKER Patrice	Médecine Interne Option Gériatrie
M.	CHEVALLIER Daniel	Urologie
Mme	FOURNIER-MEHOUAS Manuella	Médecine Physique et Réadaptation
M.	QUARANTA Jean-François	Santé Publique

Remerciements

Aux membres du Jury,

Madame le Professeur Valérie Giordanengo,
Vous me faites l'honneur de présider cette thèse,
J'ai pu apprécier votre rigueur scientifique et la richesse de votre enseignement au cours du stage dans votre service. Je vous adresse tout mon respect et ma considération.

Madame le Professeur Sabrina Sacconi,
Vous me faites l'honneur de juger cette thèse,
Veuillez trouver ici le témoignage de toute ma considération.

Madame le Docteur Annabelle Chaussenot,
Ta générosité et ta disponibilité m'ont beaucoup apporté,
Ta passion pour la clinique est pour moi un exemple,
Je suis touchée que tu aies accepté de juger ce travail.

Madame le Professeur Véronique Paquis,
Merci d'avoir accepté de superviser ce travail,
Je vous admire par vos nombreuses qualités, votre rigueur, la qualité de votre pédagogie et surtout votre humanité. Je tiens à vous témoigner toute ma gratitude et mon profond respect et je vous remercie pour votre disponibilité.

Table des matières

1 Introduction 9

1.1 Généralités 9

1.1.1 Les maladies mitochondriales 11

1.1.2 Maladies mitochondriales avec instabilité de l'ADN mitochondrial 13

1.2 Identification d'un nouveau gène responsable de maladie mitochondriale avec instabilité de l'ADN mitochondrial 21

1.3 L'identification de *CHCHD10* démontre pour la première fois qu'un défaut mitochondrial peut être à l'origine d'une maladie du motoneurone 24

1.3.1 Sclérose latérale amyotrophique 25

1.3.2 Démence frontotemporale 29

1.3.3 SMAJ 31

1.3.4 Autres maladies mitochondriales 32

1.3.5 Maladie de Charcot Marie Tooth de type 2 32

2 Objectifs du travail 33

3 Résultats 34

3.1 CHCHD10 n'est pas fréquemment impliqué dans les ataxies cérébelleuses de début tardif 34

3.2 Rôle de CHCHD10 39

4 Discussion 96

5 Conclusion 98

6 Bibliographie 99

Résumé 104

1 Introduction

1.1 Généralités

La mitochondrie est un organite intracellulaire présent dans la plupart des cellules eucaryotes. Elle permet la production d'énergie sous forme d'ATP à la cellule, grâce à la chaine respiratoire mitochondriale. La mitochondrie a une dimension de 1 à 10 µm de long et de 0,5 à 1 µm de large et elle est constituée de 2 membranes, la membrane externe et la membrane interne. Ces deux membranes délimitent 3 espaces : la matrice, l'espace inter membranaire et le cytoplasme de la cellule. La chaîne respiratoire mitochondriale se situe dans la membrane interne, qui comporte de nombreux replis ou crêtes mitochondriales.

Figure 1: Structure mitochondriale normale en microscopie électronique dans des fibroblastes humains *(d'après Bannwarth et al, 2014)*

La mitochondrie joue un rôle majeur dans le **métabolisme énergétique**. Elle permet, grâce à la chaîne respiratoire mitochondriale, de fournir l'énergie nécessaire à la cellule, en hydrolysant un métabolite hautement énergétique : l'adénosine triphosphate (ATP) en adénosine diphosphate (ADP).

Cette chaîne respiratoire mitochondriale est composée de 5 complexes formés de sous-unités protéiques codées **à la fois par le génome mitochondrial, et le génome nucléaire**, sauf le complexe II, dont les sous-unités sont codées uniquement par le génome nucléaire. L'énergie cellulaire provenant de l'oxydation des glucides, des acides gras et des acides aminés est libérée dans la matrice mitochondriale sous forme d'équivalents réducteurs (NADH/H+, $FADH_2$).

Le complexe I, NADH ubiquinone oxydoréductase, constitué de 46 sous-unités protéiques, est la porte d'entrée dans la chaîne respiratoire des électrons provenant du NADH de la matrice mitochondriale. Le complexe II, succinate-ubiquinone oxydoréductase, constitué de 4 sous-unités, est la porte d'entrée des électrons transportés par le $FADH_2$. Le complexe III, ubiquinol cytochrome *c* réductase, est constitué de 11 sous-unités. Les électrons sont transportés des complexes I et II au complexe III grâce au coenzyme Q_{10} ou ubiquinone puis transitent ensuite dans le complexe IV grâce au cytochrome *c*. Le complexe IV, cytochrome *c* oxydase, constitué de 13 sous-unités, produit des molécules d'eau à partir de l'oxygène.

L'énergie apportée par le transport d'électrons permet aux complexes I, III et IV d'expulser des protons (H+) de la matrice mitochondriale vers l'espace intermembranaire, ce qui permet d'établir un gradient de protons.

Enfin le complexe V, F0F1-ATP synthétase, est constitué de 16 sous-unités. Il utilise ce gradient de protons pour produire l'énergie électrochimique nécessaire à la phosphorylation d'ADP en ATP. Ce processus se nomme la **phosphorylation oxydative**, (cf Figure 2).

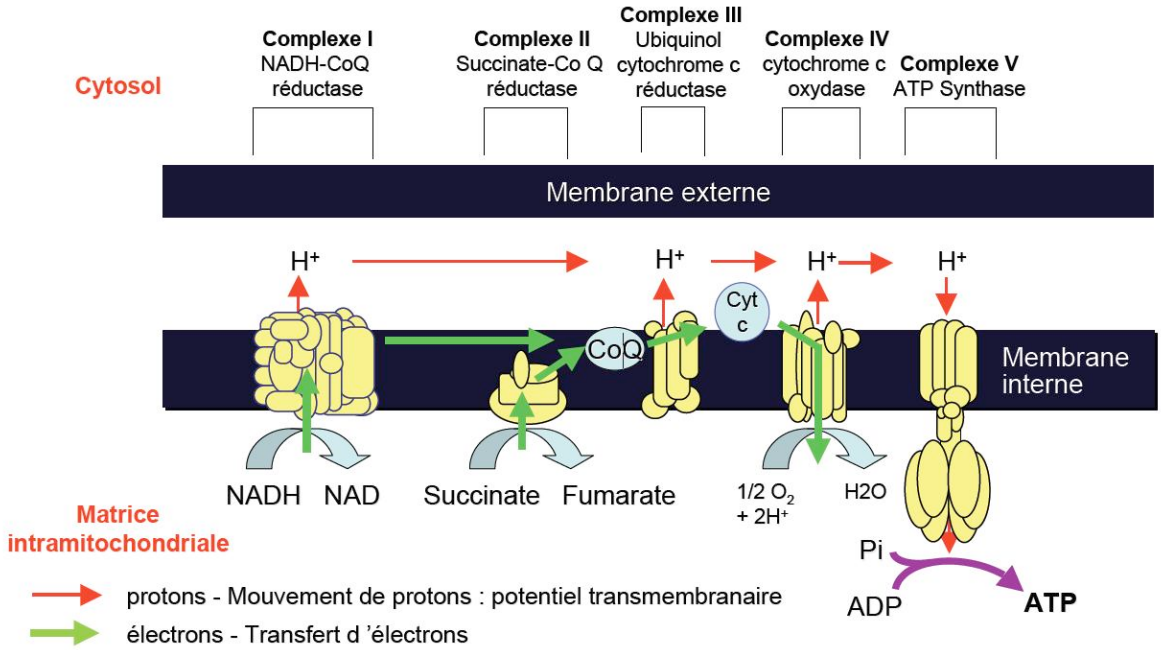


Figure 2 : La chaîne respiratoire mitochondriale et ses 5 complexes constitués de sous-unités protéiques. Les électrons et les protons transférés sont respectivement représentés par les flèches vertes et rouges.

Ce sont dans les replis des crêtes mitochondriales que se concentrent les complexes de la chaine respiratoire pour créer un environnement favorable à la phosphorylation oxydative.

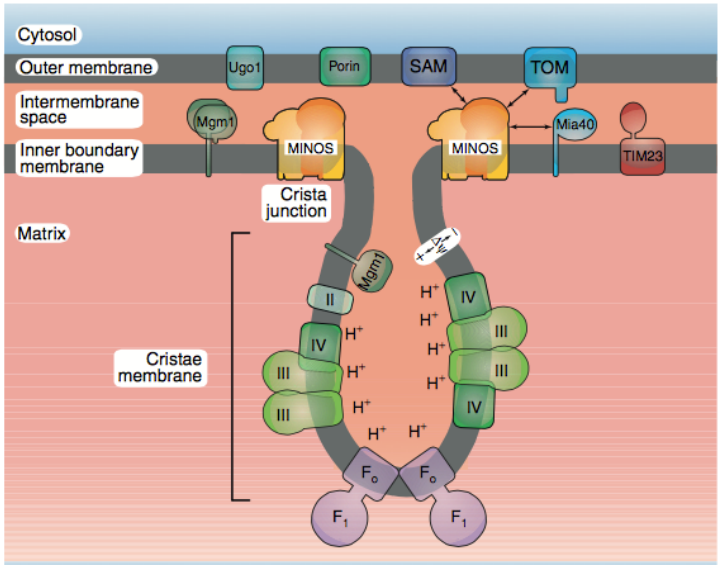


Figure 3 : Vision schématique de l'organisation des crêtes mitochondriales d'après Van der Laan et al, 2012.
Les complexes de la chaine respiratoire sont situés à l'intérieur des crêtes mitochondriales. Le complexe "Mitochondrial inner-membrane organizing system (MINOS)" est situé à proximité des crêtes et interagit avec les translocases de la membrane externe (TOM et SAM), le canal VDAC, le composant de fusion de la membrane externe Ugo1, et le récepteur intermembranaire Mia40. Les protéines TIM23 et Mia40 sont des protéines de transport et sont localisées dans la membrane interne.

1.1.1 Les maladies mitochondriales

Les maladies mitochondriales sont caractérisées par un **défaut de la chaîne respiratoire**, qui conduit à une production d'énergie insuffisante pour la cellule. Ce sont les maladies métaboliques les plus fréquentes avec une fréquence d'environ 2.5/10000 naissances. Ces pathologies sont très hétérogènes tant sur le plan clinique que génétique. Elles sont responsables de spectres cliniques très variables, allant de formes néonatales avec atteinte multiviscérale conduisant au décès précoce, à des formes de l'adulte plus modérées. Le fait que les protéines de la chaîne respiratoire soient codées à la fois par le génome nucléaire et le génome mitochondrial explique que la transmission de ces pathologies est très hétérogène. Les mutations dans les gènes nucléaires se transmettent selon un mode mendélien, alors que celles de l'ADN mitochondrial (ADNmt) ont un mode de transmission maternelle. Le nombre de protéines mitochondriales codées par le génome nucléaire est estimé à 1500 environ constituant 99% des protéines mitochondriales. Des mutations ont été identifiées dans presque 200 gènes nucléaires mais un grand nombre de ces gènes reste encore inconnu. Ces gènes codent pour des sous-unités de la chaîne respiratoire mitochondriale, des facteurs d'assemblages des complexes, des protéines contrôlant la synthèse et la stabilité de

l'ADNmt, la transcription et la traduction, la biogenèse, le métabolisme, la signalisation et la dynamique mitochondriale.

1.1.1.1 Diagnostic des maladies mitochondriales

Les pathologies mitochondriales ont des présentations cliniques très hétérogènes. Les symptômes peuvent apparaître à n'importe quel âge, toucher n'importe quel organe, ce qui augmente la difficulté du diagnostic. Le diagnostic de maladie mitochondriale peut être évoqué cliniquement en cas :

- « d'association illégitime » de symptômes neuromusculaires ou non neuromusculaires.
- de maladie d'évolution progressive
- d'implication de tissus ou d'organes n'ayant pas de fonction ou d'origine embryologique commune.

Le type de présentation clinique de ces maladies est multiple : il peut être neurologique, musculaire, cardiaque, hépatique, métabolique, hématologique…

Pour **confirmer ou écarter l'hypothèse clinique** de maladie mitochondriale, nous disposons d'outils biologiques et histologiques :

- **L'acidose métabolique avec hyperlactatémie**, associée à un rapport lactate/pyruvate (**L/P>20**) et une **élévation du rapport des corps cétoniques surtout en post-prandial (3OHbut/AcAc)** sont des arguments en faveur d'une maladie mitochondriale.
- L'analyse des muscles en microscopie optique permet d'orienter le diagnostic notamment en mettant en évidence : des **fibres COX négatives** en immunohistochimie et des **fibres ragged-red** par coloration au trichome de Gomori. Ces signes histopathologiques sont **caractéristiques de myopathie mitochondriale**.
- Le diagnostic de maladie mitochondriale est orienté par l'**étude enzymatique des complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale**, à partir des mitochondries isolées provenant des tissus atteints. Cette étude est réalisée par spectrophotométrie (mesure de l'activité enzymatique de chaque complexe) et polarographie (mesure de la respiration cellulaire). Les tissus pouvant être analysés sont le foie, le muscle, les fibroblastes, le cœur…

Une analyse complémentaire par imagerie à résonnance magnétique peut également orienter le diagnostic.

La suite de l'investigation génétique est menée en fonction de la présentation clinique, des examens d'orientation et du déficit enzymatique.

En fonction de ces éléments, notre travail d'expertise génétique au laboratoire consistera à rechercher:

i) Une mutation ponctuelle de l'ADN mitochondrial par séquençage haut-débit qui permet l'analyse exhaustive de la totalité de l'ADNmt,

ii) Une délétion unique ou des délétions multiples de l'ADNmt en effectuant une PCR long-fragment qui amplifie la totalité de l'ADNmt. Si l'on retrouve des délétions (unique, penser au Kearns Sayre ou multiples) à ce stade, elles devront être confirmées par Southern Blot.

iii) Une déplétion de l'ADNmt (diminution du nombre de copies d'ADNmt) par PCR quantitative en cas de déficit enzymatique multiple et/ou de tableau clinique évocateur, par exemple d'un syndrome d'Alpers.

Le diagnostic de certitude de maladie mitochondriale repose sur l'identification de mutations de l'ADN mitochondrial ou de l'ADN nucléaire pour les gènes codants pour des protéines ayant une fonction dans la mitochondrie.

1.1.2 Maladies mitochondriales avec instabilité de l'ADN mitochondrial

Les mitochondries possèdent leur propre ADN : l'ADN mitochondrial. Le génome mitochondrial est composé de 16,569 kilobases (kb) et code pour 37 gènes. Le nombre de molécules d'ADN mitochondrial (ADNmt) varie de 100 à plus de 1000 copies par cellule, et ce, en fonction des besoins énergétiques du type cellulaire. Ces molécules d'ADN sont associées à des protéines pour former les nucléoïdes, attachés à la membrane interne mitochondriale. Ces nucléoïdes assurent une protection et une "compaction" de l'ADN mitochondrial et contiennent notamment le facteur de transcription A (TFAM) qui tient également un rôle structurel. Les gènes sont répartis sur les 2 brins du génome mitochondrial, 13 de ces gènes codent pour des protéines des complexes de la chaîne respiratoire, 22 codent pour des ARN de transfert et 2 pour des ARN ribosomaux. Les protéines des complexes de la chaîne respiratoire codées par l'ADN mitochondrial sont principalement des sous-unités des complexes I, III, IV et V. Le complexe II n'est codé que par le génome nucléaire.

La structure de cet ADN est différente de l'ADN nucléaire : il est circulaire, il n'y a pas d'introns et il possède un code génétique différent du code universel. La transmission de l'ADNmt est également différente puisqu'elle ne se fait pas selon un mode mendélien, mais maternel. La réplication de l'ADN mitochondrial est rapide avec un taux d'erreur 10 à 100 fois plus élevé que pour la réplication de l'ADN nucléaire.

La réplication de l'ADNmt est possible *in vitro* grâce au "minimal replisome" (1). Le "minimal replisome" est composé de 3 protéines, la polymérase γ, TWINKLE et la protéine mitochondriale single-stranded binding (mtSSB). La polymérase γ est la seule ADN polymérase intervenant dans la mitochondrie, elle est composée de 2 sous unités codées par les gènes *POLG1,* qui code pour la sous-unité catalytique et *POLG2*, qui code pour la sous-unité accessoire. TWINKLE est une hélicase mitochondriale codée par *C10orf2* ou *TWINKLE* et mtSSB a un rôle de stabilisation de l'ADN simple brin mitochondrial et est codée par le gène *SSBP1* (2). Toutes les protéines nécessaires à la réplication de l'ADNmt sont codées par le génome nucléaire. Elles sont traduites dans le cytosol, puis importées dans la mitochondrie, grâce à un signal d'adressage mitochondrial.

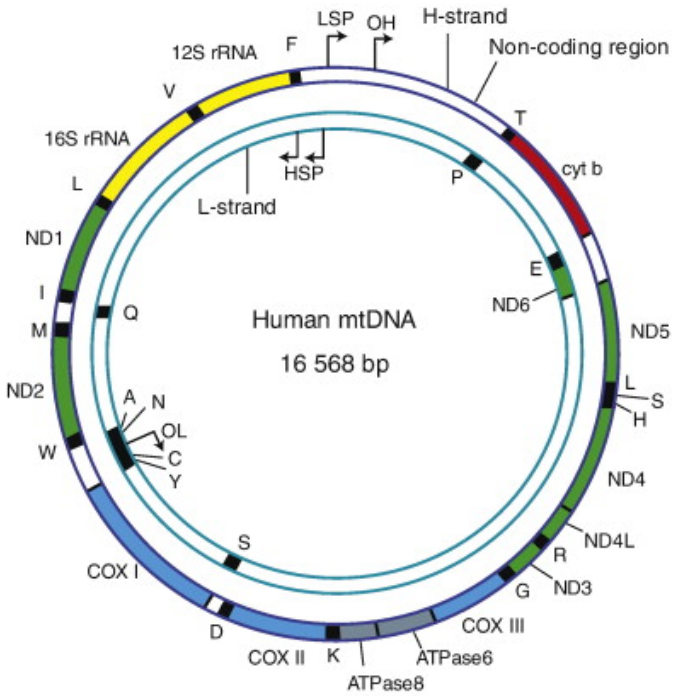


Figure 4. Le génome mitochondrial humain (1)**.** Les gènes codants pour le complexe I (NADH déshydrogénase) sont en vert, le gène codant pour le complexe III (cytochrome b) sont en rouge et ceux codants pour le complexe IV (COX) sont en bleu et ceux codants pour le complexe V en gris. Les ARN de transfert sont en noir et les ARN ribosomaux sont en jaune.

La **stabilité de l'ADNmt** fait intervenir de nombreux facteurs, **tous codés par le génome nucléaire**, puis importés dans la mitochondrie. Les pathologies mitochondriales avec instabilité du génome mitochondrial sont liées à des mutations dans ces gènes nucléaires. Elles conduisent à un déficit de la chaîne respiratoire mitochondriale et se traduisent par des **anomalies quantitatives** (déplétion ou diminution du nombre de copies de l'ADNmt) **ou qualitatives** (délétions multiples) **de l'ADNmt**. Les déplétions de l'ADNmt sont responsables de formes multiviscérales létales de l'enfant (MDS ou Mitochondrial Depletion Syndrome) alors que les délétions multiples de l'ADNmt s'observent dans des formes souvent plus modérées de l'adulte. Ces pathologies se transmettent selon un mode autosomique, confirmant leur origine nucléaire. A ce jour, il existe 3 catégories de gènes impliqués dans la stabilité de l'ADN mitochondrial (présentées dans le **tableau 1**):

- les gènes codants pour des protéines directement impliquées dans la **réplication de l'ADN mitochondrial** tels que *POLG1, POLG2*, *C10orf2 (*ou *TWINKLE, PEO1)*(1)
- les gènes codants pour des **protéines impliquées dans la régulation du pool de nucléotides** (dNTP) tels que *TYMP, TK2, DGUOK, ANT1 (ou SLC25A4)*
- les gènes codants pour des **protéines impliquées dans la dynamique mitochondriale** tels que *MFN2, OPA1 ou DLP1*.

A ce jour, l'identification de ces gènes chez les patients repose sur une analyse séquentielle par technique de Sanger, un séquençage haut débit avec ciblage d'un panel de gènes déjà identifiés, ou sur la réalisation d'un exome (séquençage de l'ensemble des exons du génome) lorsqu'aucun diagnostic n'a pu être réalisé et que la présomption clinico-biologique de maladie mitochondriale est forte.

Rôle dans la stabilité de l'ADN mitochondrial	Gènes et localisation	Mode de transmission
Réplication de l'ADN mitochondrial	*POLG1, POLG2, PEO1* *POLG1, PEO1*	AD AR
Régulation du pool de nucléotides	*TYMP, TK2, DGUOK, MPV17, TK2* *SUCLG1, SUCLA2, RRM2B* *ANT1, RRM2B*	AR AR AD
Dynamique mitochondriale	*MFN2, OPA1*	AD

Tableau 1 : Gènes impliqués dans la stabilité de l'ADN mitochondrial et mode de transmission (AD=Autosomique Dominant ; AR=Autosomique Récessif)

1.1.2.1 Mutations dans les gènes codant pour des protéines impliquées dans la réplication de l'ADNmt

La réplication de l'ADN mitochondrial est contrôlée par des gènes nucléaires et de nombreux facteurs protéiques interviennent dans ce processus.

Des mutations dans le gène *POLG1* sont responsables d'atteintes très hétérogènes sur le plan clinique.

- **Le syndrome d'Alpers**. Ce syndrome extrêmement sévère est caractérisé par une triade d'épilepsie réfractaire, régression psychomotrice et maladie hépatique. Il est de transmission autosomique récessive. Les enfants naissent asymptomatiques généralement puis les premiers signes apparaissent entre 2 et 4 ans. On retrouve des anomalies à l'IRM cérébrale, un pic de lactates à la spectro-IRM, un déficit de la chaine respiratoire mitochondriale et une déplétion de l'ADNmt dans le muscle ou le foie (3).
- **Les syndromes du spectre « myo-cérébro-hépathopathie de l'enfant ».** Les formes avec atteinte myo-cérébro-hépathique sont rares et surviennent classiquement avant 3 ans. Les signes cliniques comprennent un retard du développement psychomoteur, un retard de croissance, une acidose lactique et une myopathie. D'autres signes peuvent être associés comme une insuffisance hépatique, une atteinte rénale, une pancréatite, des vomissements et une surdité. Il n'y a pas d'épilepsie, du moins au début de la maladie. Le pronostic est fatal plus rapidement que dans le syndrome d'Alpers (4).
- **Les syndromes avec <u>M</u>yoclonic <u>E</u>pilepsy <u>M</u>yopathy <u>S</u>ensory <u>A</u>taxia (MEMSA).** MEMSA correspond à un spectre où prédominent l'épilepsie, la myopathie et l'ataxie mais sans ophtalmoplégie, par ailleurs très fréquemment retrouvée dans les atteintes mitochondriales. La maladie commence après l'adolescence. Une polyneuropathie sensitive peut conduire à une ataxie et est en général le premier signe de la maladie. L'épilepsie se développe plus tardivement et peut être réfractaire aux traitements comme dans tous les spectres associés à *POLG1* (3).
- **Les syndromes du spectre ataxie, neuropathie**. Ces syndromes regroupent des pathologies ayant pour signes principaux l'ataxie et la neuropathie en

l'absence d'atteinte musculaire. Ils comprennent notamment les syndromes MIRAS (MItochondrial Recessive Ataxia Syndrome) et SCAE (SpinoCerebellar Ataxia with Epilepsy syndrome) (5). Ce qui les distingue du spectre MEMSA est la présence d'une ophtalmoplégie externe progressive avec ou sans myopathie. Une encéphalopathie épileptique est souvent présente. D'autres signes peuvent être associés comme des myoclonies, une cécité, une surdité et une insuffisance hépatique (3).

- **Une ophtalmoplégie externe progressive autosomique dominante** : Cliniquement, cette atteinte se traduit par un ptosis et une paralysie des muscles oculomoteurs. Il peut s'y associer une myopathie se traduisant par une intolérance à l'effort (6). Certains patients présentent également des degrés variables de surdité, de neuropathie axonale, d'ataxie, de dépression, de syndrome Parkinsonien, d'hypogonadisme et de cataracte.

Des mutations dans *TWINKLE* sont majoritairement associées sur le plan clinique à une **ophtalmoplégie externe progressive de transmission autosomique dominante (adPEO)** (7). D'autres mutations de **transmission autosomique récessive** ont été décrites chez des patients ayant une **atteinte hépatique et cérébrale associée à une déplétion de l'ADNmt** (8).

1.1.2.2 Mutations dans les gènes codant pour des protéines impliquées dans la régulation du pool de nucléotides

L'atteinte des enzymes impliquées dans la régulation du pool de nucléotides peut entrainer un déséquilibre du pool de dNTP et altérer la fonction de réplication de l'ADN mitochondrial. Ceci peut favoriser l'apparition de mutations, de délétions de l'ADNmt et/ou empêcher la réplication et induire une déplétion de l'ADN mitochondrial. L'expression clinique de ces anomalies est très hétérogène :

- **Le syndrome MNGIE (pour Mitochondrial NeuroGastroIntestinal Encephalopathy)** est caractérisé par un ptosis, un PEO, des anomalies de motilité intestinale, une cachexie, une neuropathie périphérique, une myopathie et une leucoencéphalopathie (9). Il est causé par des mutations dans le gène *TYMP* codant pour la thymidine phosphorylase et se transmet

sur un mode autosomique récessif. Classiquement, la maladie débute entre la deuxième et la cinquième décade.

- Des mutations dans *TK2* sont responsables de **myopathies rapidement progressives** pouvant apparaître dès l'enfance (10). La progression des signes cliniques peut rapidement entraîner le décès par défaillance respiratoire, mais des formes plus modérées ont également été décrites. *TK2* code pour une thymidine kinase mitochondriale, requise pour la phosphorylation des nucléosides pyrimidine des cellules post-mitotiques (11).

- Des mutations dans *DGUOK* sont décrites en majorité à l'état autosomique récessif et peuvent être responsables d'un **syndrome hépatocérébral infantile**. *DGUOK* code pour la deoxyguanosine kinase qui est essentielle pour la voie de sauvetage des nucléosides puriniques. Les symptômes chez les individus atteints apparaissent dès les premiers mois de vie, avec une mortalité élevée par défaillance hépatique avant 2 ans (12). La plupart des patients développent également des signes neurologiques, tels qu'un nystagmus, un retard de développement et une hypotonie.

1.1.2.3 Mutations dans les gènes codants pour des protéines impliquées dans la dynamique mitochondriale

Dans chaque cellule, le réseau mitochondrial est interconnecté et les mitochondries communiquent entre elles continuellement grâce à une dynamique de fusion et de fission.

Les protéines impliquées dans ce phénomène sont présentées dans le **tableau 2**.

Nom de la protéine		Localisation	Fonctions
Protéines pro fusion	OPA1	Membrane interne mitochondriale	Fusion de la membrane interne. Maintien des jonctions des crêtes et régulation du relargage du cytochrome C. Assemblage et stabilité des complexes de la chaîne respiratoire. Maintien de l'ADNmt par un probable rôle d'ancrage des nucléoïdes à la membrane interne.
	MFN1 et MFN2 (mitofusines)	Membrane externe mitochondriale et réticulum endoplasmique	Fusion de la membrane externe mitochondriale. Intéractions avec le réticulum endoplasmique et l'homéostasie calcique (MFN2) Transport axonal des mitochondries grâce au complexe Mitochondrial Rho GTPase protein 1 (MIRO1)-Milton.
protéines pro fission	DRP1	Cytoplasme	Perméabilisation de la membrane externe mitochondriale mediée par le facteur pro-apoptotique BAX.
	FIS1	membrane externe mitochondriale	Interactions avec le réticulum endoplasmique pour réguler l'apoptose
	OPA3	membrane externe mitochondriale	Contrôle du métabolisme des lipides et de la thermogénèse
	GDAP1	membrane externe mitochondriale	Régulation de la phosphorylation oxydative et de l'apoptose

Tableau 2: Ensemble des protéines impliquées dans la dynamique mitochondriale. *D'après Burté et al., 2014*

La mobilité mitochondriale est indissociable des phénomènes de fission/fusion. Le transport mitochondrial permet de répartir le réseau mitochondrial au niveau des sites subcellulaires les plus demandeurs en ATP. Il joue un rôle très important dans les cellules hautement polarisées telles que les neurones. Comme pour la fission, la fusion mitochondriale doit s'adapter aux évènements cellulaires tels que la division cellulaire, les modifications de métabolismes, la différenciation cellulaire ou encore l'apoptose. La plupart des signaux qui permettent de réguler la fusion mitochondriale sont des interactions protéiques, des modifications post-traductionnelles et des modifications de l'environnement lipidique. La régulation peut se faire au niveau de l'activité des mitofusines ou de OPA1. L'équilibre entre fusion/fission est essentiel pour la physiologie neuronale.

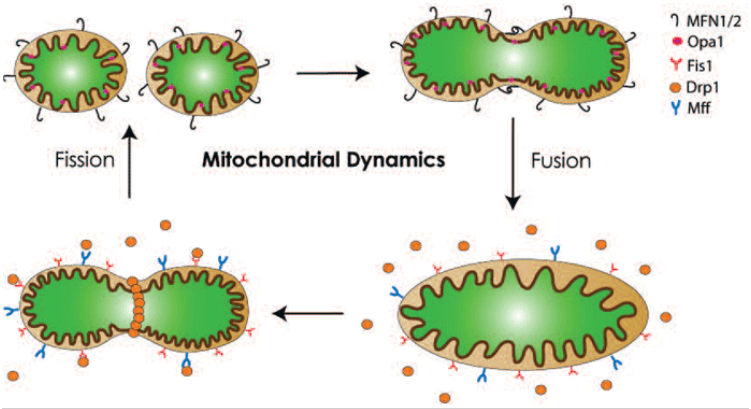


Figure 5 : Vision schématique de la dynamique mitochondriale humaine. *D'après Tieu et Imm., 2014.* La dynamique mitochondriale sollicite les protéines de fusion et de fission mitochondriale. La fusion est un processus hautement régulé qui requiert la coordination de la membrane interne et la membrane externe mitochondriale. Pour coordonner la fusion des 2 membranes, la membrane externe utilise les mitofusines 1 et 2 (MFN1 et MFN2 et la membrane interne utilise OPA1. Concernant la fission, la protéine Fis-1 et le mitochondrial fission factor (Mff), localisés au niveau de la membrane externe mitochondriale, recruitent Drp1. Celle-ci va s'oligomériser et former un anneau de constriction autour de la zone de fission et va diviser la mitochondrie en 2.

Les protéines régulant la dynamique mitochondriale sont également impliquées dans le **processus d'autophagie** notamment dans la formation de l'autophagosome, grâce à PINK1 et l'E3 ubiquitine-protein ligase. Ce processus est utile pour identifier et éliminer les mitochondries endommagées qui pourraient nuire au fonctionnement de la cellule. La dynamique mitochondriale garantit un contrôle qualité mitochondrial, et son déséquilibre peut engendrer une accumulation de mitochondries altérées et qui ne pourraient plus assurer leur fonction de production d'ATP *via* la chaîne respiratoire.

La dynamique mitochondriale est également importante pour la stabilité de l'ADN mitochondrial; notamment, en participant au rôle d'ancrage de l'ADNmt *via* les nucléoïdes grâce à OPA1 et par le mélange des protéines de la matrice impliquées dans la réparation de l'ADNmt.

DRP1, codée par *DLP1,* est une protéine localisée dans le cytosol et qui est recrutée aux abords des sites de fission par le mitochondrial fission factor (Mff).

Conséquences du dysfonctionnement de la dynamique mitochondriale en termes de pathologies :

- Des mutations dans *OPA1* sont à l'origine de phénotypes **d'atrophie optique autosomique dominante (Dominant Optic Atrophy : DOA)**, responsables de cécité (13). Certains patients peuvent présenter un dysfonctionnement mitochondrial plus généralisé, et développer d'autres complications neuromusculaires (**DOA+**). Des études ont également permis d'impliquer des

défauts de la dynamique mitochondriale dans des maladies neurodégénératives plus fréquentes telles que la maladie de Parkinson (14).

- *MFN2* a été impliqué dans la maladie de **Charcot-Marie-Tooth type 2A** (15). Plus récemment, notre équipe a montré pour la première fois que ce gène était impliqué dans des maladies avec instabilité de l'ADNmt, grâce à une grande famille présentant un phénotype **d'atrophie optique, des signes de neuropathie périphérique et de myopathie mitochondriale associée à des délétions multiples de l'ADNmt** (16).
- **Un cas de mutation hétérozygote dans le gène *DLP1*** a été rapporté dans la littérature chez une petite fille présentant une microcéphalie, une anomalie de développement cérébral, une atrophie optique et une augmentation persistante des lactates avec une augmentation des acides gras plasmatiques modérée. Un défaut de fission a été mis en évidence à la fois dans la mitochondrie et dans les peroxysomes. La patiente présentait des troubles de l'alimentation et est rapidement décédée malgré une supplémentation alimentaire (17).

1.2 Identification d'un nouveau gène responsable de maladie mitochondriale avec instabilité de l'ADN mitochondrial

Malgré l'identification récente de plusieurs gènes impliqués dans des pathologies mitochondriales avec instabilité de l'ADNmt, les anomalies moléculaires à l'origine de la pathologie sont inconnues chez la plupart des patients. L'identification de nouveaux gènes et de nouveaux mécanismes à l'origine de ces maladies est indispensable pour (i) **confirmer le diagnostic**, (ii) **donner un conseil génétique fiable**, (iii) **proposer un diagnostic prénatal** et, (iiii) **mieux connaître les mécanismes physiopathologiques qui permettront d'envisager des thérapeutiques ciblées**. Récemment, notre équipe s'est intéressée à une grande famille présentant un phénotype complexe, de début tardif, associant une myopathie mitochondriale avec délétions multiples de l'ADNmt, une maladie du motoneurone, une démence frontotemporale et une ataxie cérébelleuse.

1.2.1.1 Présentation de la famille

Le cas index était une femme de 67 ans qui a présenté une ataxie cérébelleuse évoluant depuis l'âge de 50 ans, compliquée d'un syndrome bulbaire progressif, d'une démence et d'une surdité neurosensorielle. L'examen clinique montrait une ataxie cérébelleuse, une atteinte du motoneurone par la présence d'un signe de Babinski, une

aréflexie et une paralysie bulbaire avec dysarthrie et dysphagie. Les tests neuropsychologiques ont révélé un syndrome frontal. Elle est décédée à l'âge de 67 ans. Parmi les 7 autres membres de la famille qui ont bénéficié d'une biopsie de muscle, 3 présentaient une maladie du motoneurone, 2 présentaient une ataxie cérébelleuse, et 2 présentaient, de façon similaire au cas index, une maladie du motoneurone associée à une ataxie cérébelleuse. L'âge de début des symptômes allait de 49 à 65 ans. Tous les patients ont développé des troubles cognitifs, évoquant une démence d'allure frontotemporale sauf le patient V-2, qui est décédé à 51 ans, un an après le début de symptômes évoquant une sclérose latérale amyotrophique. Une atteinte musculaire était retrouvée : soit sous la forme d'une faiblesse musculaire proximale chez 4 membres de la famille (IV-3, IV-11, IV-13 and IV-15), soit sous la forme d'un ptosis bilatéral et d'une parésie faciale observée chez le patient IV-15.

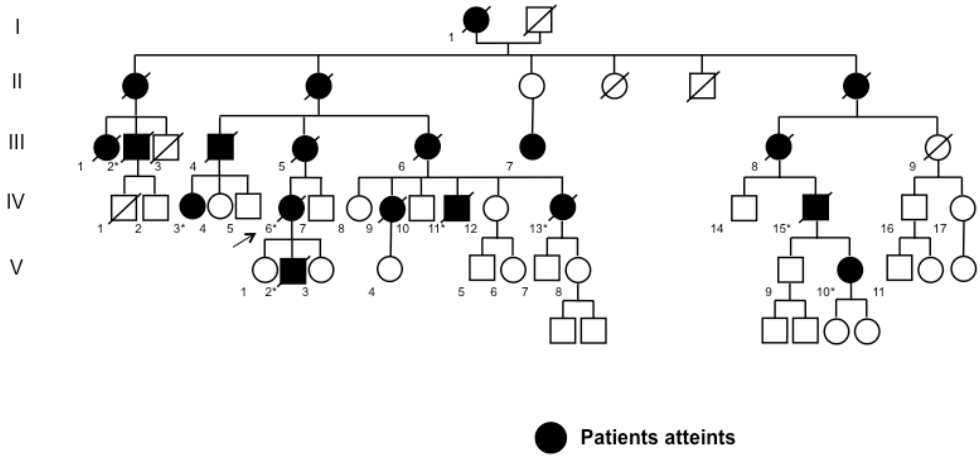


Figure 6. Arbre généalogique de la famille. *D'après Bannwarth et al., 2014.*

Tous les patients atteints de cette famille ayant bénéficié d'une biopsie musculaire, représentés sur la figure 6 par un astérisque, présentaient :

- **Des fibres COX négatives et ragged-red** ainsi qu'une **accumulation lipidique et glycogénique** à l'étude histologique musculaire
- Des **déficits multiples de la chaîne respiratoire**, avec notamment une diminution de l'activité des complexes I et IV chez les patients III-2, IV-6 et IV-11, un déficit du complexe III chez le patient IV-3 et un déficit des complexes I, III, IV

et V chez le patient V-2.

- Des **délétions multiples de l'ADN mitochondrial** mises en évidence par technique PCR XL et confirmées en Southern Blot.

Les autres membres atteints de la famille, n'ayant pas eu de biopsie musculaire, présentaient une démence et un syndrome bulbaire associant dysarthrie et dysphagie.

Le séquençage des gènes impliqués dans la stabilité de l'ADN mitochondrial et compatibles avec ce phénotype (*POLG, SLC25A4, C10orf2*) n'a révélé aucune mutation. Une analyse d'exome des patients V-10 et IV-11 a retrouvé une mutation faux sens c.176C>T (p.Ser59Leu) située dans l'exon 2 du gène *CHCHD10*, à l'état hétérozygote. **Cette mutation n'était pas répertoriée dans les différentes bases de données** (dbSNP132, Exome Variant Server (EVS), 1000 Genome databases, HapMap) et n'était pas mise en évidence chez 100 contrôles de même ethnicité et géographie. Elle ségrégeait dans la famille et n'était pas retrouvée chez des membres de la famille sains de 69 et 79 ans. **La ségrégation inter-espèces montrait que la sérine en position 59 est très bien conservée** et **l'analyse *in silico*** par les différents outils bioinformatiques de prédiction de pathogénicité (Mutation Taster http://www.mutationtaster.org/), SIFT (http://sift.jcvi.org/) et Polyphen-2 (http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/) **concluait à un effet potentiellement pathogène de cette mutation**. L'ensemble de ces arguments permet d'attester de la pathogénicité probable de cette mutation.

Le gène *CHCHD10* code pour une protéine mitochondriale dont la fonction était jusqu'alors inconnue. C'est une protéine qui contient des hélices en doubles spirales contenants des résidus cystéine.

Ce travail a permis de montrer que cette protéine est localisée dans l'espace inter membranaire mitochondrial et plus précisément, enrichie à la jonction des crêtes mitochondriales. De plus, l'analyse du réseau mitochondrial des fibroblastes du patient V-10 a révélé que cette mutation entraîne une fragmentation du réseau mitochondrial (18). Cette fragmentation évoque un défaut de fusion mitochondriale mais nous avons montré, par un test direct de fusion, qu'il n'y a pas de défaut de fusion mitochondriale dans les fibroblastes des patients (18).

L'association d'une atteinte du motoneurone et d'une démence d'allure frontotemporale dans cette famille nous a conduit à séquencer le gène *CHCHD10* dans une cohorte 115 patients présentant une démence frontotemporale avec sclérose latérale amyotrophique (DFT-SLA). La mutation p.Ser59Leu a été retrouvée dans une

famille, d'origine espagnole, de DFT-SLA. Un nouveau variant: c.100C>T (p.Pro34Ser) a été également identifié chez 2 individus non apparentés. La fréquence de DFT-SLA imputable à une mutation dans *CHCHD10* est évaluée à 2,6% dans cette cohorte (19).

1.3 L'identification de *CHCHD10* démontre pour la première fois qu'un défaut mitochondrial peut être à l'origine d'une maladie du motoneurone

Suite à l'identification de *CHCHD10* chez ces patients, d'autres études ont rapporté des mutations de ce gène dans des cohortes de SLA pure familiale et sporadique conduisant ainsi secondairement à l'identification d'un nouveau gène associé au spectre clinique de la DFT-SLA (20–25). De plus, Penttilä et ses collègues ont identifié une mutation fondatrice de *CHCHD10* (c.197G>T; p.Gly66Val) dans 17 familles finlandaises avec neuropathie motrice spinale d'apparition tardive (SMAJ) ; cette mutation étant également (26) responsable de maladie de Charcot-Marie-Tooth de type 2 (CMT2) (27).
Les atteintes du motoneurone isolées sont rarement vues dans les maladies mitochondriales. D'un autre côté, bien que de nombreux travaux aient rapporté un dysfonctionnement mitochondrial dans des modèles humains et murins de SLA, sa signification restait incertaine et controversée. L'idée que des mutations dans des gènes mitochondriaux puissent causer des maladies du motoneurone reposait uniquement sur quelques-uns des cas rapportés dans la littérature (pour une revue cf. (Hirano et al., 2008) (28)). Crugnola et ses collègues ont effectué des biopsies musculaires systématiques chez 50 patients présentant une SLA sporadique typique. Ils ont retrouvé une myopathie mitochondriale avec fibres COX-négatives chez 23 patients sur 50 (46%) (29). Des mitochondries anormales, un déficit de la chaîne respiratoire ou des défauts dans le transport des protéines mitochondriales trouvés dans des modèles de SLA et chez les patients étaient d'autres éléments plaidant en faveur de l'impact d'une dysfonction mitochondriale dans la genèse de la maladie. Toutefois, **l'identification de *CHCHD10* est la première preuve démontrant l'implication initiale d'un dysfonctionnement mitochondrial dans les maladies du motoneurone.**

1.3.1 Sclérose latérale amyotrophique

1.3.1.1 Introduction sur la sclérose latérale amyotrophique

La sclérose latérale amyotrophique (SLA) est une pathologie neurodégénérative du motoneurone supérieur et inférieur. Elle est responsable d'une paralysie progressive, par atteinte du motoneurone, entrainant le décès par défaillance respiratoire. Le premier cas a été observé par Aran en 1848, puis Cruveillhier en 1863, mais ce n'est qu'en 1869 que Charcot l'a identifiée et définie en tant que sclérose latérale amyotrophique (30). Il l'a décrite comme étant une maladie jamais héritée, mais plus tard, Kurland et Mulder rapportaient une série de 58 cas comprenant 10% de formes familiales. Jusqu'à récemment, la sclérose latérale amyotrophique était considérée comme une atteinte dégénérative du motoneurone pure, mais aujourd'hui, on considère qu'elle fait partie d'un spectre clinique très large. La variabilité clinique s'exprime tant par la différence de l'âge d'apparition des signes cliniques (2ème décade à 9ème décade), les premiers symptômes décrits (atteinte bulbaire ou spinale inaugurale), l'évolution plus ou moins rapide (entraînant le décès en 3 ans ou permettant une survie de 10 ans après le début des symptômes), que par son association ou pas à une démence frontotemporale (ou à un déclin cognitif modéré).

1.3.1.2 Epidémiologie

Sur le plan épidémiologique, l'incidence de la SLA est de 2,4 pour 100 000 habitants par an, et la prévalence de 4 à 6 nouveaux cas pour 100 000 habitants avec une légère prédominance masculine (1,3 hommes pour 1 femme). Les formes sporadiques représentent 90% des cas et les formes familiales 10% des cas de SLA.

1.3.1.3 Sur le plan génétique

Il existe de nombreux gènes responsables de sclérose latérale amyotrophique. Le premier gène découvert fut *SOD1* en 1993, grâce à une étude de liaison (31). *SOD1* code pour la superoxyde dismutase-1, une enzyme cytoplasmique antioxydante qui métabolise les radicaux libres superoxydes en peroxyde d'hydrogène et molécules d'oxygène. Des mutations dans *SOD1* sont identifiées dans 12% des formes familiales ainsi que dans 1 à 2% des formes sporadiques de sclérose latérale amyotrophique (32).

C9orf72 a été découvert lors d'une étude d'association pangénomique (genome wide association study (GWAS)). La mutation responsable est une expansion de

l'hexanucléotide GGGGCC située dans le premier intron du gène *C9orf72*, localisé en 9p21 (33). La fonction de la protéine codée par ce gène est inconnue, mais elle aurait un rôle dans le transport endosomal au sein des cellules neuronales humaines et de souris (34). L'expansion hexanucléotidique entraine une accumulation de transcrits tronqués. Les répétitions transcrites se lient aux ribonucléoprotéines en fonction de leur conformation. Il s'agit de la mutation la plus fréquemment mise en évidence dans la sclérose latérale amyotrophique familiale (40%) et sporadique (7%) (35)(36)(32). Cette expansion d'hexanucléotides est également retrouvée dans 25% des cas familiaux de DFT.

A ce jour, les gènes les plus fréquemment impliqués dans la SLA sont dans l'ordre décroissant *C9orf72, SOD1, CHCHD10, TARDBP et FUS* (21) (37) (38). *TARDBP* et *FUS* sont impliqués dans 4% des formes familiales et 1% des formes sporadiques. Néanmoins, nous connaissons l'étiologie génétique de seulement 2/3 des cas de SLA familiales et de 11% des cas sporadiques

Il y a également beaucoup d'autres gènes impliqués dans la SLA (**Tableau 2**).

1.3.1.4 Physiopathologie de la sclérose latérale amyotrophique

Les **inclusions intracytoplasmiques ubiquitine-positives** dans les cellules du système nerveux central (SNC) sont une signature histopathologique caractéristique de la sclérose latérale amyotrophique et de la démence frontotemporale (DFT). Ces inclusions sont le résultat de l'accumulation de la protéine TDP-43 ubiquitinée, qui s'aggrège dans le cytoplasme ou le noyau des neurones du SNC (39). Cette protéine est codée par le gène *TARDBP* et des mutations dans ce gène ont été identifiées comme responsable de 4% de cas familiaux, et 1% des cas sporadiques de DFT-SLA (37) (38).

D'autres mécanismes physiopathologiques sont également rapportés associés à des mutations spécifiques d'autres gènes (**Tableau 3**)

Processus physiopathologique	Gène et localisation
Production ARN toxique	***C9orf72 (9p21.2)***
Agrégation toxique	***SOD1 (21q22.11)***
Dysfonction du métabolisme ADN/ARN	***FUS (16p11.2), TARDBP (1p36.22),*** *SETX (9q34.13), MATR3 (5q31.2)*
Dysfonction du métabolisme de l'ARN messager	*TAF15 (17q11.1q11.2), HNRNPA1 (12q13.1), HNRNPA2B1 (7p15), GLE1 (9q34.11)*
Dysfonction du mécanisme de réparation de l'ADN	*SPG11 (15q14)*
Dysfonction du mécanisme d'autophagie	*SQSTM1 (5q35), UBQLN2 (Xp11.21), VCP (9p13.3), OPTN (10p13)*
Dysfonction de la voie du réticulum endoplasmique	*SIGMAR1 (9p13.3), ERLIN2 (8p11.2)*
Dysfonction mitochondriale	***CHCHD10 (22q11.23)***
Modulation de la dynamique de l'endosome	*ALS2 (2q33.1)*
Autres mécanismes	*ANG (14q11.1q11.2), VAPB (20q13.33), ERBB4 (2q33.3q34), DCTN1 (2p13), ARHGEF28 (5q13.2), PFN1 (17p13.3), PNPLA6 (19p13.2)*

Tableau 3. Récapitulatif des gènes impliqués dans la SLA et physiopathologie associée (d'après Guerreiro *et al.,* Cell 2015 (40))

1.3.1.5 Description clinique des patients atteints de sclérose latérale amyotrophique avec mutation dans CHCHD10

En réponse au premier article de l'équipe (Bannwarth *et al.,* 2014), plusieurs groupes ont publié d'autres mutations dans *CHCHD10.* L'équipe de Muller a retrouvé la mutation p.Gly66Val chez un patient finlandais qui présentait une forme clinique ascendante, progressive avec une atteinte des membres inférieurs (23). Un autre article décrit la même mutation chez 9 patients d'une famille finlandaise. De manière intéressante, les phénotypes des sujets atteints sont très variables au sein de la même famille, allant d'une neuropathie sensitivomotrice proximale, à une amyotrophie spinale ou un cas semblable à une sclérose latérale amyotrophique à un stade précoce (41). Une deuxième mutation, p.Arg15Leu a été mise en évidence par l'équipe de Muller chez 7 patients issus d'une cohorte de 102 patients allemands qui présentaient une sclérose latérale amyotrophique. Ces patients présentaient une atteinte initiale des membres supérieurs. De plus, ces patients semblent développer une atteinte bulbaire de façon plus précoce que dans l'évolution classique de la maladie. D'après ce travail et le nôtre, les formes de SLA associées à une mutation dans *CHCHD10* semblent être associées à une progression plus lente de la maladie (l'évolution étant comprise entre 6 et 17 ans). L'équipe de Johnson a également testé une cohorte de 85 patients présentant une SLA

familiale et a retrouvé la mutation p.Arg15Leu chez 5 patients qui partagent le même haplotype de 6,2Mb autour du gène (21).

L'équipe de Chiò a testé *CHCHD10* dans une cohorte de 288 patients atteints d'une SLA. Ils ont mis en évidence la mutation p.Pro34Ser chez 3 patients (soit environ 1%). Ces patients présentaient tous une SLA pure, sans atteinte cognitive ou cérébelleuse. Par contre, l'évolutivité des symptômes est hétérogène puisque 2 de ces 3 patients se sont rapidement détériorés. De plus, 2 des patients présentaient initialement des symptômes bulbaires alors que le troisième patient souffrait d'une atteinte débutant au niveau des ceintures.

L'équipe de Ronchi a analysé *CHCHD10* chez des patients présentant une SLA sporadique issus d'une cohorte italienne. Sur les 217 patients testés, ils ont mis en évidence la mutation p.Pro34Ser (2/3) et p.Pro80Leu (1/3) dans ce gène pour 3 patients, soit 1,3% de fréquence dans cette cohorte. L'âge de début est extrêmement variable (25-75 ans) avec une moyenne à 53 ans (24).

De manière intéressante, l'équipe de Kurzwelly a décrit 4 patients porteurs de la mutation p.Arg15Leu et présentant un phénotype de SLA, avec des signes d'atteintes des membres supérieurs, ainsi que des signes oculomoteurs à type de nystagmus (pour 1 patient sur les 4) faisant évoquer une atteinte cérébelleuse (22).

Une récente étude espagnole a également analysé *CHCHD10* dans une cohorte de 1224 patients présentant une sclérose latérale amyotrophique, une démence frontotemporale ou un phénotype associant les 2 pathologies. Ils ont mis en évidence 2 nouvelles mutations p.Pro12Ser et p.Gln82X. La première était retrouvée chez un patient qui avait développé une forme classique de SLA à 58 ans, avec une évolution de 11 ans entraînant le décès, sans atteinte cognitive. La deuxième mutation a été mise en évidence chez une patiente de la cohorte DFT, dont l'atteinte a débuté par des troubles de la mémoire à court terme à l'âge de 58 ans, et a évolué vers une désorientation spatiale et des difficultés de langage. A ce phénotype d'aphasie progressive non fluente s'associait des signes parkinsoniens. Il existe donc 8 différentes mutations dans *CHCHD10* considérées comme pathogènes présentées dans le **tableau 4** (42).

La pathogénicité des mutations p.Pro34Ser et p.Pro96Thr est controversée. En effet, la mutation p.Pro34Ser a été retrouvée chez des contrôles non atteints aux USA/UK, Canada et Italie, et la mutation p.Pro96Thr était présente à l'état homozygote chez 2 patients atteints de SLA et était également retrouvée chez 3 contrôles. Ces 2 mutations

étaient également retrouvées à de très faibles fréquences dans les bases de données 1KG Project Consortium et ExAC (43)(42). Néanmoins, le travail réalisé au cours de mon master et présenté dans l'article n°2, montre que l'expression de l'allèle muté *CHCHD10*^{P34S} dans des cellules HeLa entraîne les mêmes anomalies que l'expression de l'allèle *CHCHD10*^{S59L} avec notamment une fragmentation du réseau mitochondrial ainsi qu'une désorganisation des crêtes mitochondriales. Ce travail prouve la pathogénicité de la mutation p.Pro34Ser, l'absence de signes cliniques décrite chez certains porteurs pouvant s'expliquer par un problème de pénétrance et/ou début tardif de la symptomatologie.

Mutations décrites	Forme familiale ou sporadique	Pathologies décrites	Nombres de cas décrits et références
p.Pro12Ser	Familiale ?	SLA	1 (Dols-Icardo *et al.*, 2015)
p.Arg15Leu	Familiale Sporadique	SLA	2 (Muller *et al.*, 2014) 1 (Zhang *et al.*, 2015) 5 (Johnson *et al.*, 2014) 4 (Kurzwelly *et al.*, 2015)
p.Pro23Thr	Familiale	DFT	1 (Zhang *et al.*, 2015)
P.Ala35Asp	Sporadique	DFT	1 (Zhang *et al.*, 2015)
p.Ser59Leu	Familiale	DFT-SLA	2 (Bannwarth *et al.*, 2014)
p.Gly66Val	Familiale	SLA	1(Muller *et al.*, 2014)
p.Pro80Leu	Sporadique	SLA DFT-SLA	1 (Zhang *et al.*, 2015) 1 (Ronchi *et al.*, 2015)
p.Gln82X	Sporadique	DFT	1 (Dols-Icardo *et al.*, 2015)
p.Pro34Ser	Sporadique	DFT-SLA SLA DFT SLA SLA DFT	2 (Chaussenot *et al.*, 2014) 2 (Ronchi *et al.*, 2015) 2 (Dobson-Stone *et al.*, 2015) 3 (Chio *et al.*, 2015) 2 (Dols-Icardo *et al.*, 2015 4 (Dols-Icardo *et al.*, 2015)
p.Pro96Thr	Sporadique	ALS	2 (Dols-Icardo *et al.*, 2015)

Tableau 4. Mutations dans *CHCHD10* décrites dans la littérature et impliquées dans les DFT-SLA

1.3.2 Démence frontotemporale

1.3.2.1 Epidémiologie

L'âge de début se situe généralement entre 45 et 64 ans. L'incidence est évaluée entre 2.7 et 4.1/100,000. Il n'y a pas de prédominance de la maladie selon le genre. La survie est estimée entre 3 et 14 ans mais est variable selon les études et l'échantillonnage de la

population étudiée. La forme clinique de DFT variante comportementale est la plus fréquemment retrouvée (60%).

1.3.2.2 Présentation clinique

La présentation clinique est liée à la topographie de l'atteinte de la dégénérescence. Il est décrit 3 principaux syndromes cliniques de démence frontotemporale (DFT), définis sur la présentation clinique.

- Premièrement, le variant comportemental de DFT « behavioural variant frontotemporal dementia ». Cette forme clinique se présente avec un déclin progressif dans les compétences interpersonnelles et exécutrices. Les troubles comportementaux sont au premier plan. Le patient a une réponse émotionnelle altérée, il peut être apathique, désinhibé, obsessionnel. Les tests neuropsychiques peuvent révéler un déficit des fonctions exécutives ayant recours à la formulation d'une stratégie, une inhibition, ou une abstraction. La mémoire et les fonctions corticales postérieures sont préservées. Une atrophie, avec hypoperfusion ou hypométabolisme dans la région frontale ventro-médiale et du pôle temporal, peut être mise en évidence sur l'IRM cérébrale morphologique et fonctionnelle et PET-scan. Il y a une absence d'éléments évocateurs de maladie d'Alzheimer sur les biomarqueurs dans le LCR (44).
- La démence frontotemporale avec démence sémantique « semantic dementia » se caractérise par une perte progressive de la mémoire sémantique. On peut observer à l'IRM, une atrophie avec asymétrie antéroinférieure corticale du lobe temporal associée à un hypométabolisme.
- La troisième forme clinique est l'aphasie progressive non-fluente « progressive non-fluent aphasia ». Elle se caractérise par une altération progressive du langage entrainant une aphasie progressive. Le trouble du langage est initialement isolé, sans trouble cognitif associé au début de la maladie.

1.3.2.3 Gènes impliqués dans la démence fronto-temporale

Processus physiopathologique	*Gène et localisation*
Aggrégation toxique	*MAPT (17q21.1)*
Autophagie, voie lysosomale, inflammation	*PGRN (17q21.32)*
Inflammation	*TREM2 (6p21.1)*
Autophagie, voie lysosomale	*CHMP2B (3p11.2)*
Production ARN toxique	***C9orf72 (9p21.2)***
Dysfonction du mécanisme d'autophagie	*SQSTM1 (5q35), UBQLN2 (Xp11.21), VCP (9p13.3), OPTN (10p13)*
Dysfonction mitochondriale	***CHCHD10 (22q11.23)***
Dysfonction du métabolisme des ARN messagers	*HNRNPA1 (12q13.1), HNRNPA2B1 (7p15)*
Dysfonction de la voie du réticulum endoplasmique	*SIGMAR1 (9p13.3)*

Tableau 5. Physiopathologie et gènes impliqués dans la démence frontotemporale (d'après Guerreiro *et al.,* Cell 2015 (40))

- La sclérose latérale amyotrophique et la démence frontotemporale font partie d'un même spectre clinique. Ces 2 pathologies peuvent être présentes chez un même patient, ou au sein d'une même famille. On retrouve des gènes déjà décrits (*C9orf72, SQSTM1, UBQLN2, VCP, OPTN, CHCHD10, HNRNPA1, HNRNPA2B1 et SIGMAR1)* impliqués dans les 2 pathologies.

1.3.3 SMAJ

Récemment, Penttilä et ses collègues ont identifié une mutation faux-sens c.197G>T p.Gly66Val dans le gène *CHCHD10* chez 17 familles finlandaises présentant un syndrome d'atteinte du motoneurone inférieur survenant à l'âge adulte, selon un mode de transmission autosomique dominant (45). Ce syndrome a déjà été décrit par la même équipe, sous le nom d'amyotrophie spinale de type Jokela ou SMAJ (**S**pinal **M**uscular **A**trophy **J**okela-type) (46). Cliniquement, les premiers symptômes sont observés en moyenne à 42 ans. Les patients souffrent de crampes et de fasciculations, associées à un déficit musculaire à CPK élevées, majoritairement proximal, et une aréflexie ostéo-tendineuse. Plus occasionnellement, des tremblements, des troubles sensitifs et des symptômes bulbaires sont rapportés. L'évolution des symptômes demeure lente et ne met pas en jeu le pronostic vital.

1.3.4 Autres maladies mitochondriales

Une autre équipe s'est intéressée au phénotype que présente une grande famille portoricaine (47). Ils décrivent, chez les membres atteints de cette famille, des signes d'intolérance à l'effort et une myopathie proximale dans la première décade de vie de transmission autosomique dominante et d'évolution lentement progressive. L'analyse des biopsies musculaires orientait, grâce à la présence de fibres « ragged-red » et d'accumulation lipidique, vers une myopathie mitochondriale. De plus, une analyse par microscopie électronique montrait des anomalies structurelles de l'architecture des myofibrilles et une augmentation du nombre des mitochondries contenant des crêtes circulaires anormales avec des inclusions globulaires et une marginalisation des mitochondries. Une diminution d'activité du complexe IV de la chaîne respiratoire mitochondriale était également associée. Le séquençage du génome mitochondrial et une analyse qualitative de la stabilité de l'ADN mitochondrial par Southern Blot n'a révélé aucune anomalie.

Une analyse de liaison a suggéré l'implication d'un locus en 22q11 et 19 gènes candidats ont été sélectionnés. Une analyse complémentaire à l'aide du logiciel MitoCarta (logiciel de prédiction de localisation mitochondriale) a permis de retenir le gène *CHCHD10* comme le gène candidat présentant le plus haut score de probabilité. Le séquençage de *CHCHD10* chez le cas index a retrouvé 2 variants faux-sens en *cis*: c.43C>A (p.Arg15Ser) et c.172G>C (p.Gly58Arg) qui co-ségrégeaient parfaitement avec la pathologie dans la famille. De plus, ces variants n'étaient pas retrouvés dans les bases de données et dans les sujets contrôles de même ethnicité. L'expression du variant p.Gly58Arg dans des cellules HeLa entraînait une fragmentation du réseau mitochondrial, contrairement à celle de p.Arg15Ser, suggérant que la variation en position 58 était responsable de la pathologie.

1.3.5 Maladie de Charcot Marie Tooth de type 2

Une récente étude de 107 familles présentant un phénotype de Charcot Marie Tooth de type 2 (CMT2) a mis en évidence la mutation c.197G>T (p.Gly66Val) dans *CHCHD10* chez 6 familles finlandaises. Cette mutation n'était pas retrouvée ni chez 104 individus finlandais sains, ni dans la base de données « 1000 genome project » (http://1000genomes.org/). Cliniquement, les patients présentent une faiblesse

musculaire des membres inférieurs lentement progressive, puis une atteinte au niveau des mains plus tard dans l'évolution de la maladie. L'installation des symptômes varie de 30 à 56 ans (moyenne de 44 ans). Aucun signe de maladie du motoneurone, de syndrome bulbaire ou d'atteinte cognitive n'est décrit chez ces patients. Cependant chez 3 des 12 patients testés présentant la mutation, le phénotype de CMT2 est cliniquement chevauchant avec le SMAJ (27).

2 Objectifs du travail

Les objectifs de mon travail de thèse étaient :

- de déterminer si le spectre clinique des pathologies associées au gène *CHCHD10* concernait aussi les ataxies cérébelleuses dans la mesure où ce signe clinique était présent chez 5 patients sur 8 dans notre famille initiale. Pour répondre à cette question, j'ai analysé par séquençage direct de *CHCHD10* une cohorte de 78 patients présentant une ataxie cérébelleuse (Article n°1).
- de caractériser le rôle de la protéine CHCHD10 pour expliquer le lien entre des mutations de ce gène et les signes cliniques retrouvés chez les patients. En effet depuis les 2 publications initiales de notre équipe en 2014, de nombreuses mutations de *CHCHD10* ont été retrouvées dans des phénotypes cliniques très variés, impliquant notamment une atteinte du motoneurone. Mieux connaître le rôle de CHCHD10 permettra de comprendre comment un dysfonctionnement mitochondrial peut être à l'origine de la mort des neurones moteurs. Cette partie du travail a été réalisée dans le cadre de mon stage de Master 2 (Article n°2).

3 Résultats

3.1 CHCHD10 n'est pas fréquemment impliqué dans les ataxies cérébelleuses de début tardif

A la suite de la découverte de l'implication de *CHCHD10* dans les pathologies telles que la sclérose latérale amyotrophique, la démence frontotemporale, le SMAJ, la maladie de Charcot-Marie-Tooth et des myopathies mitochondriales, nous nous sommes interrogés sur l'implication de *CHCHD10* dans les ataxies cérébelleuses. En effet, ce signe clinique est retrouvé chez 5 des 8 patients présentant la mutation p.Ser59Leu dans la première grande famille que nous avons étudiée (18).

J'ai donc analysé *CHCHD10* dans une cohorte de 78 patients qui présentent une ataxie cérébelleuse et pour lesquels les causes génétiques connues d'ataxie cérébelleuse avaient été éliminées (les Ataxies SpinoCérébelleuses (SCA) 1, 2, 3, 6, 7, 17 dans les formes dominantes familiales et l'ataxie de Friedreich pour les cas sporadiques). Cette cohorte était composée de 61 cas sporadiques et 17 cas familiaux d'ataxie cérébelleuse survenue à l'âge adulte. La moyenne d'âge de survenue des symptômes était estimée à 47 ans ± 14 ans, et l'âge moyen, lors du prélèvement sanguin, est de 54 ans ± 14 ans. L'ataxie cérébelleuse était isolée chez 15% des patients (12/78) et était associée chez 85% des patients (66/78); 20% des patients présentaient aussi un syndrome pyramidal (16/78), 17% une neuropathie (14/78), 9% une atteinte cognitive (7/78) (dont une démence frontotemporale), 5% des troubles neuropsychiatriques (4/78), 10% une surdité (8/78) et 6% des patients présentaient un ptosis (5/78). Sur les 48 patients qui ont bénéficié d'une biopsie musculaire, 12 présentaient une myopathie mitochondriale confirmée sur le plan histologique par la présence de fibres cox-négatives et de fibres ragged-red au trichome de Gomori. Cinq de ces patients avaient également des délétions multiples de l'ADN mitochondrial dans le muscle, confirmées par Southern Blot.

Le séquençage du gène *CHCHD10,* à l'aide de la technique de référence de Sanger, n'a pas mis en évidence de mutation pathogène. Seuls des polymorphismes connus ont été retrouvés (48).

Cette première étude indique que les mutations de *CHCHD10* ne sont pas fréquentes dans les ataxies cérébelleuses. Il faudra continuer à tester ce gène dans de plus grandes cohortes d'ataxie cérébelleuse, présentant des origines

géographiques différentes, afin d'évaluer l'implication réelle de *CHCHD10* dans cette pathologie.

Article N°1

Journal of the Neurological Sciences 351 (2015) 196–197

Contents lists available at ScienceDirect

Journal of the Neurological Sciences

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jns

Letter to the Editor

Letter to the Editor on a paper by Hsiao C-T, Tsai P-C, Liao Y-C, Lee Y-C, Soong B-W. *C9ORF72* repeat expansion is not a significant cause of late-onset cerebellar ataxia syndrome. J Neurol Sci 2014;347:322–324.

Keywords:
Cerebellar ataxia
Amyotrophic lateral sclerosis (ALS)
Frontotemporal dementia (FTD)
CHCHD10
Mitochondrial disease

Sir,

A GGGGCC hexanucleotide repeat expansion in the *C9ORF72* gene has been initially demonstrated to be a common cause of frontotemporal dementia-amyotrophic lateral sclerosis (FTD-ALS) [1,2]. *C9ORF72* repeat expansion has also been associated with parkinsonian syndrome, Huntington's disease-like syndrome and dementia syndrome. Several individuals presenting with cerebellar ataxia have also been reported to carry the *C9ORF72* expansion mutation. In order to elucidate the relationship between the *C9ORF72* mutation and cerebellar ataxia, Hsiao and colleagues screened a Chinese cohort of 429 patients with idiopathic late-onset cerebellar ataxia [3]. They found that none of the 429 patients had the *C9ORF72* expansion mutation and conclude that their finding does not support that the mutation plays any significant role in cerebellar ataxia.

Recently, we identified *CHCHD10* as a novel gene responsible for FTD-ALS [4]. The phenotypic spectrum of *CHCHD10*-related disorders has rapidly expanded. It includes mitochondrial myopathy, sporadic and familial pure amyotrophic lateral sclerosis (ALS) and late-onset spinal motor neuropathy (SMAJ) (for a review see Bannwarth and colleagues) [5]. Studies from different groups suggest that the prevalence of *CHCHD10* mutations in sporadic ALS might follow the one of *C9ORF72* and *SOD1*. In the original family that reported with a heterozygous mutation (c.176C>T; p.Ser59Leu) in the *CHCHD10* gene, the patients presented with a late-onset neurological phenotype including cerebellar ataxia [6]. Around fifty of age, affected individuals presented with different symptoms including motor neuron disease (MND), frontotemporal dementia (FTD) and mitochondrial myopathy. Furthermore, five out of the 8 patients presented with cerebellar ataxia, this symptom being not associated with MND in 2 cases out of 8. In addition, signs of cerebellar disorder were also reported by Kurzwelly and colleagues in an ALS family carrying the c.44G>T (p.Arg15Leu) mutation in *CHCHD10* [7]. Among the 4 ALS kindreds, one individual had a cerebellar oculomotor disorder with abnormal smooth pursuits, dysmetric saccades and gaze-evoked nystagmus. These results suggest that *CHCHD10*-related diseases might possibly include cerebellar ataxia and raise the question of the relationship between the *CHCHD10* gene and this disorder.

We screened *CHCHD10* in a French cohort of 78 patients presenting with adult-onset cerebellar ataxia (17 familial and 61 sporadic cases). The mean age at onset was 47 ± 14 years and the mean age at examination was 54 ± 14.3 years. Cerebellar ataxia was pure in 15% of patients (12/78) and was associated with other signs in 85% of cases (66/78): pyramidal syndrome was found in 20% (16/78), polyneuropathy in 17% (14/78), cognitive impairment in 9% (7/78) including 1 FTD, psychiatric symptoms in 5% (4/78), deafness in 10% (8/78) and ptosis in 6% of patients (5/78). Twelve patients had a mitochondrial myopathy with ragged-red and/or cytochrome *c* oxidase (COX) negative fibers on muscle biopsy that was associated with multiple mtDNA deletions by Southern blot analysis in 5 patients out of the 12. Spinocerebellar ataxias (SCAs) 1, 2, 3, 6, 7, and 17 had been previously at least excluded in autosomal dominant familial cases and Friedreich ataxia in sporadic cases. Sequencing of the *CHCHD10* gene (NM_213720.1) was performed as previously described [4]. We found that none of the 78 patients carried a *CHCHD10* variant in this cohort.

Hereditary spinocerebellar ataxias are phenotypically and genetically heterogeneous. They are characterized by progressive ataxia that could be associated with a broad spectrum of neurological or other clinical findings. At least half of autosomal dominant SCAs are caused by $(CAG)_n$ repeat expansions resulting in expanded polyglutamine tracts (SCAs 1, 2, 3, 6, 7, 17, and DRPLA). However, many individuals with ataxia are unable to obtain a molecular diagnosis, suggesting that more genes need to be discovered. Elden and colleagues had already shown a common genetic origin between SCA and an increased risk of ALS with polyglutamine expansions in *ATXN2* [8]. In addition, the mutations in the *SETX* gene are responsible for Ataxia with Oculomotor Apraxia 2 (AOA2) [9] and juvenile-onset rare form of amyotrophic lateral sclerosis 4 (ALS4) [10]. All together, these findings suggest a possible genetic link between ALS and cerebellar ataxia. Both *C9ORF72* and *CHCHD10* are involved in FTD-ALS clinical spectrum and the aim of this study was to determine the contribution of the *CHCHD10* gene to SCA. Our results show that *CHCHD10* mutations are not a common cause of cerebellar ataxia but further investigations in larger populations with different geographic origins are needed to define the real involvement of *CHCHD10* in these diseases.

Conflict of interest statement

The co-authors have no conflicts of interest.

Acknowledgments

This work was funded by grants from the Fondation pour la Recherche Médicale (FRM) DPM201211255 to V.P.-F. Morgane Plutino was granted an FRM Fellowship (DEA20130727390).

http://dx.doi.org/10.1016/j.jns.2015.02.025
0022-510X/© 2015 Elsevier B.V. All rights reserved.

References

[1] DeJesus-Hernandez M, Mackenzie IR, Boeve BF, Boxer AL, Baker M, Rutherford NJ, et al. Expanded GGGGCC hexanucleotide repeat in noncoding region of *C9ORF72* causes chromosome 9p-linked FTD and ALS. Neuron 2011;72:245–56. http://dx.doi.org/10.1016/j.neuron.2011.09.011.

[2] Renton AE, Majounie E, Waite A, Simón-Sánchez J, Rollinson S, Gibbs JR, et al. A hexanucleotide repeat expansion in *C9ORF72* is the cause of chromosome 9p21-linked ALS-FTD. Neuron 2011;72:257–68. http://dx.doi.org/10.1016/j.neuron.2011.09.010.

[3] Hsiao C-T, Tsai P-C, Liao Y-C, Lee Y-C, Soong B-W. *C9ORF72* repeat expansion is not a significant cause of late onset cerebellar ataxia syndrome. J Neurol Sci 2014;347:322–4. http://dx.doi.org/10.1016/j.jns.2014.10.042.

[4] Chaussenot A, Le Ber I, Ait-El-Mkadem S, Camuzat A, de Septenville A, Bannwarth S, et al. Screening of *CHCHD10* in a French cohort confirms the involvement of this gene in frontotemporal dementia with amyotrophic lateral sclerosis patients. Neurobiol Aging 2014;35. http://dx.doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2014.07.022 [2884.e1-4].

[5] Bannwarth S, Ait-El-Mkadem S, Chaussenot A, Genin EC, Lacas-Gervais S, Fragaki K, et al. Reply to: a distinct clinical phenotype in a German kindred with motor neuron disease carrying a *CHCHD10* mutation. Brain 2015. http://dx.doi.org/10.1093/brain/awv015 [in press].

[6] Bannwarth S, Ait-El-Mkadem S, Chaussenot A, Genin EC, Lacas-Gervais S, Fragaki K, et al. A mitochondrial origin for frontotemporal dementia and amyotrophic lateral sclerosis through *CHCHD10* involvement. Brain 2014;137:2329–45. http://dx.doi.org/10.1093/brain/awu138.

[7] Kurzwelly D, Krüger S, Biskup S, Heneka MT. A distinct clinical phenotype in a German kindred with motor neuron disease carrying a *CHCHD10* mutation. Brain 2015. http://dx.doi.org/10.1093/brain/awv014 [in press].

[8] Elden AC, Kim H-J, Hart MP, Chen-Plotkin AS, Johnson BS, Fang X, et al. Ataxin-2 intermediate-length polyglutamine expansions are associated with increased risk for ALS. Nature 2010;466:1069–75. http://dx.doi.org/10.1038/nature09320.

[9] Moreira M-C, Klur S, Watanabe M, Németh AH, Le Ber I, Moniz J-C, et al. Senataxin, the ortholog of a yeast RNA helicase, is mutant in ataxia-ocular apraxia 2. Nat Genet 2004;36:225–7. http://dx.doi.org/10.1038/ng1303.

[10] Chen Y-Z, Bennett CL, Huynh HM, Blair IP, Puls I, Irobi J, et al. DNA/RNA helicase gene mutations in a form of juvenile amyotrophic lateral sclerosis (ALS4). Am J Hum Genet 2004;74:1128–35. http://dx.doi.org/10.1086/421054.

Morgane Plutino
IRCAN, UMR CNRS 7284/INSERM U1081/UNS, School of Medicine, Nice Sophia-Antipolis University, France

Annabelle Chaussenot
Samira Ait-El-Mkadem
Sylvie Bannwarth
IRCAN, UMR CNRS 7284/INSERM U1081/UNS, School of Medicine, Nice Sophia-Antipolis University, France
Department of Medical Genetics, National Centre for Mitochondrial Diseases, Nice Teaching Hospital, France

Emmanuelle C. Genin
IRCAN, UMR CNRS 7284/INSERM U1081/UNS, School of Medicine, Nice Sophia-Antipolis University, France

Cécile Rouzier
Gaëlle Augé
IRCAN, UMR CNRS 7284/INSERM U1081/UNS, School of Medicine, Nice Sophia-Antipolis University, France
Department of Medical Genetics, National Centre for Mitochondrial Diseases, Nice Teaching Hospital, France

Sabrina Sacconi
National Centre for Neuromuscular Disorders, CNRS UMR6543, Nice University Hospital, France

Jean Pouget
Department of Neurology, Timone Hospital, Marseille Teaching Hospital, France

Véronique Paquis-Flucklinger
IRCAN, UMR CNRS 7284/INSERM U1081/UNS, School of Medicine, Nice Sophia-Antipolis University, France
Department of Medical Genetics, National Centre for Mitochondrial Diseases, Nice Teaching Hospital, France

11 February 2015

3.2 Rôle de CHCHD10

Un premier travail de notre équipe avait permis de montrer que la protéine *CHCHD10* est localisée dans l'espace inter membranaire mitochondrial et plus précisément, enrichie à la jonction des crêtes mitochondriales. L'analyse du réseau mitochondrial des fibroblastes des patients de la grande famille initiale avait révélé que la mutation p.Ser59Leu entraîne une fragmentation du réseau mitochondrial mais n'entraine pas de défaut de fusion (18).

Dans ce nouveau travail, nous avons montré que CHCHD10 interagit avec la mitofiline, une protéine faisant partie du complexe MINOS (nouvellement nommé **MICOS** : **MI**tochondrial Contact Site and **C**ristae **O**rganizing **S**ystem) (49). En utilisant des gels en 2 dimensions à partir de cerveau de souris ou de fibroblastes humains, CHCHD10 a été retrouvée au sein du même complexe protéique que la mitofiline, CHCHD3 et CHCHD6. De plus, nous avons montré qu'il existe une désorganisation partielle de ce complexe dans les fibroblastes de patients. **Ces résultats montent que CHCHD10 fait partie du complexe MICOS, indispensable à l'organisation des crêtes mitochondriales. L'expression de la mutation p.Ser59Leu entraine une désorganisation de ce complexe protéique qui explique les anomalies des crêtes mitochondriales retrouvées chez les patients.**

Les molécules d'ADN mitochondrial sont attachées à la membrane mitochondriale interne grâce à des nucléoprotéines, dans une fraction insoluble, formant les nucléoïdes. Etant donné que nous avions montré que les mutations dans *CHCHD10* entrainent une déstructuration des crêtes, nous avons voulu vérifier si les nucléoïdes étaient impactés par cette désorganisation structurelle. Nous avons analysé le nombre de nucléoïdes par immunofluorescence et nous avons constaté une diminution significative du nombre de nucléoïdes dans les fibroblastes de patients porteurs de la mutation p.Ser59Leu à l'état hétérozygote par rapport à des cellules contrôles, sans diminution du nombre de copies d'ADN mitochondrial et sans variation de la taille des nucléoïdes.
Nous nous sommes demandé comment cette diminution du nombre de nucléoïdes sans augmentation de taille pouvait ne pas s'accompagner d'une diminution du nombre de copies d'ADN mitochondrial. Pour tenter de répondre à cette question, nous avons isolé les mitochondries de fibroblastes de patients et quantifié par PCR quantitative, l'ADNmt

présent dans les fractions insoluble (membranaires) et soluble en émettant l'hypothèse qu'une partie de l'ADN mitochondrial pourrait ne plus être liée à la membrane et être libérée dans la matrice. Nous avons retrouvé de l'ADNmt dans la fraction soluble des cellules de patients alors que la totalité de l'ADNmt était retrouvé dans la fraction membranaire des fibroblastes contrôles. **La mutation p.Ser59Leu entraine donc une diminution du nombre de nucléoïdes, sans modification de leur taille, et induit un relargage partiel d'ADN mitochondrial dans la matrice mitochondriale.**

Nous avons ensuite émis l'hypothèse que cette désorganisation des nucléoïdes pourrait avoir un effet sur la réparation de l'ADNmt. Pour tester cette hypothèse, nous avons soumis les fibroblastes de patients porteurs de la mutation p.Ser59Leu à un stress oxydatif par traitement par H_20_2. Nous avons constaté que la réparation de l'ADNmt est retardée dans les fibroblastes de patients par rapport aux fibroblastes contrôles. Cette altération du mécanisme de réparation de l'ADN explique probablement l'accumulation de délétions multiples de l'ADN mitochondrial dans les tissus post-mitotiques tels que les muscles de patients. **La mutation p.Ser59Leu entraine une altération de la capacité à réparer l'ADN mitochondrial dans des conditions de stress oxydatif.**

Une autre cause d'accumulation de molécules d'ADNmt délété pouvant être liée à un défaut de mitophagie, nous avons testé l'autophagie et le transfert des mitochondries aux lysosomes dans les fibroblastes de patients sans retrouver d'anomalie. Par contre, nous avons noté un retard au relargage du cytochrome *c* dans les fibroblastes de patients avec une inhibition du processus apoptotique caspase-dépendant dans ces cellules et dans des lignées HeLa exprimant les allèles mutés, (Genin EC *et al,* EMBO Mol Med en révision).

Au total, cette étude constitue un premier lien entre des mutations dans un gène codant pour une protéine du complexe MICOS et une pathologie humaine. La mutation p.Ser59Leu dans *CHCHD10* entraine une désorganisation du complexe MICOS, une déstructuration des crêtes mitochondriales induisant un déficit de la chaine respiratoire mitochondriale, une désorganisation des nucléoïdes avec un défaut de réparation de l'ADN mitochondrial et une inhibition de l'apoptose.

Article N°2

CHCHD10 mutation leads to loss of mitochondrial cristae junctions and mtDNA repair deficiency

Emmanuelle C. Genin[1], Morgane Plutino[1], Sylvie Bannwarth[1,2], Elodie Villa[3], Eugenia Cisneros-Barroso[4], Madhuparna Roy[5], Bernardo Ortega-Vila[4], Konstantina Fragaki[1,2], Françoise Lespinasse[1], Estefania Pinero-Martos[4], Gaëlle Augé[1,2], David Moore[6,7], Florence Burté[6,7], Sandra Lacas-Gervais[8], Yusuke Kageyama[5], Patrick Yu-Wai-Man[6,7], Hiromi Sesaki[5], Jean-Ehrland Ricci[3], Cristofol Vives-Bauza[4], Véronique Paquis-Flucklinger[1,2]

[1]IRCAN, UMR CNRS 7284/INSERM U1081/UNS, School of Medicine, Nice Sophia-Antipolis University, France
[2]Department of Medical Genetics, National Centre for Mitochondrial Diseases, Nice Teaching Hospital, France
[3]INSERM U1065, Centre Méditerranéen de Médecine Moléculaire (C3M), équipe "contrôle métabolique des morts cellulaires", Nice Sophia-Antipolis University, France.
[4]Research Health Institute of Palma (IdISPa), Research Unit- Son Espases, University Hospital, Spain
[5]Department of Cell Biology, Johns Hopkins University School of Medicine, Baltimore, MD, USA
[6]Wellcome Trust Centre for Mitochondrial Research, Institute of Genetic Medicine, International Centre for Life, Newcastle University, Newcastle upon Tyne NE1 3BZ, UK
[7]Newcastle Eye Centre, Royal Victoria Infirmary, Newcastle upon Tyne, NE1 4LP, UK
[8]Joint Center for Applied Electron Microscopy, Nice Sophia-Antipolis University, France

Running title: *CHCHD10* mutations and mitochondrial dysfunction

Keywords: CHCHD10 / mitochondria / mitochondrial disease / motor neuron disease / mtDNA instability

Correspondence to:

Prof. Véronique Paquis-Flucklinger

IRCAN UMR CNRS 7284 / INSERM U1081 / UNS

School of Medicine, 28 av de Valombrose,

06107 Nice cedex 2, France.

Tel: (33) 4 93 37 77 86

Fax: (33) 4 93 37 70 33

e-mail: paquis@hermes.unice.fr

ABSTRACT

CHCHD10-related diseases include mitochondrial DNA instability disorder, frontotemporal dementia-amyotrophic lateral sclerosis (FTD-ALS) clinical spectrum, late-onset spinal motor neuropathy (SMAJ) and Charcot-Marie-Tooth disease type 2 (CMT2). Here, we show that CHCHD10 resides with mitofilin, CHCHD3 and CHCHD6 in the "mitochondrial contact site and cristae organizing system" (MICOS) complex. *CHCHD10* mutations lead to MICOS complex disassembly and loss of mitochondrial cristae with a decrease in nucleoid number which are also disorganized. Repair of the mitochondrial genome after oxidative stress is impaired in *CHCHD10* mutant fibroblasts and this likely explains the accumulation of deleted mtDNA molecules in patient muscle. *CHCHD10* mutant fibroblasts are not defective in the delivery of mitochondria to lysosomes suggesting that impaired mitophagy does not contribute to mtDNA instability. Interestingly, the expression of *CHCHD10* mutant alleles inhibits apoptosis by preventing cytochrome *c* release.

INTRODUCTION

Seminal studies over the past two decades have identified a growing list of nuclear-encoded mitochondrial genes linked to mitochondrial DNA (mtDNA) instability, either due to mtDNA depletion syndrome or disorders characterized by multiple deletions (Copeland and Longley, 2014). If the involvement of nuclear genes responsible for either mtDNA replication/repair or nucleotide pool maintenance was predictable, that of genes falling in other categories such as *MFN2*, which is involved in mitochondrial fusion, was rather unexpected. Recently, we identified *CHCHD10* as a new gene responsible for mtDNA instability disorder (Bannwarth et al., 2014). We described a novel heterozygous *CHCHD10* mutation (c.176C>T; p.Ser59Leu) in a large French family with a phenotype including cognitive decline resembling frontotemporal dementia (FTD), motor neuron disease (MND), cerebellar ataxia and mitochondrial myopathy with multiple mtDNA deletions. The association of FTD with MND in this family led us and others to sequence *CHCHD10* in cohorts of patients with frontotemporal dementia-amyotrophic lateral sclerosis (FTD-ALS) or with pure familial or sporadic ALS. Fascinatingly, *CHCHD10* mutations were identified in these independent cohorts, firmly establishing a pathophysiological link with FTD-ALS clinical spectrum (Chaussenot et al., 2014; Chiò et al., 2015; Johnson et al., 2014; Kurzwelly et al., 2015; Müller et al., 2014; Ronchi et al., 2015; Zhang et al., 2015). Furthermore, Penttilä and colleagues identified a founder mutation in *CHCHD10* (c.197G>T; p.Gly66Val) in 17 Finnish families with late-onset spinal motor neuropathy (SMAJ) (Penttilä et al., 2015), and this variant is also responsible for Charcot-Marie-Tooth disease type 2 (CMT2) (Auranen et al., 2015).

CHCHD10 encodes a mitochondrial protein located in the intermembrane space and enriched at cristae junctions but the role played by this protein in both normal and disease

states has not yet been established (Bannwarth et al., 2014). Here, we show that CHCHD10 is a component of the mitochondrial contact site and cristae organizing system (MICOS) complex (Pfanner et al., 2014). The expression of *CHCHD10* mutant alleles leads to MICOS complex disassembly, loss of mitochondrial cristae and nucleoid disorganization leading to a defect in mtDNA repair after oxidative stress. Interestingly, the expression of *CHCHD10* mutant alleles inhibits apoptosis by preventing cytochrome *c* release. Our findings support previous studies suggesting that, in some ALS models, motor neuron death can occur *via* caspase-independent apoptotic mechanisms.

RESULTS

CHCHD10 is a component of the MICOS complex that is destabilized in *CHCHD10* mutant fibroblasts

We previously found that CHCHD10 was enriched in the vicinity of mitochondrial cristae junctions as reported for mitofilin, a major component of the MICOS complex (Jans et al., 2013). In order to determine whether CHCHD10 is a component of MICOS, we performed Blue-Native PAGE analysis followed by 2D-western blotting. Results in mouse brain demonstrated that CHCHD10 forms part of a multiprotein complex containing the inner membrane mitochondrial proteins mitofilin, CHCHD3 and CHCHD6 (Fig.1A).

We analyzed the effects of *CHCHD10* mutant allele on MICOS complex in fibroblasts from our original family carrying the p.Ser59Leu *CHCHD10* mutation (Bannwarth et al., 2014). In our original study, we analyzed fibroblasts from Patient V-10 (P1). Fibroblasts from a second patient (IV-3; P2) have since become available and they showed the same pathological abnormalities, namely, a multiple respiratory chain deficiency (supplementary Table 1), mitochondrial ultrastructural alterations and fragmentation of the mitochondrial network (supplementary Fig.1). The expression of matrix-targeted photoactivatable GFP confirmed

that mitochondrial fusion is not inhibited in fibroblasts of patients carrying the p.Ser59Leu *CHCHD10* mutation (supplementary Fig.2).

Blue-Native PAGE followed by 2D-western blotting confirmed that, in human fibroblasts, CHCHD10 resides with mitofilin, CHCHD3 and CHCHD6 in the MICOS complex. We also observed a partial disassembly of the complex in fibroblasts of both patients compared with control cells (Fig.1B-C). The protein levels of assembled CHCHD10 and CHCHD3 were significantly decreased in patient fibroblasts and by contrary CHCHD6 levels were increased (Fig. 1C). BN-PAGE analysis also revealed an impairment of OXPHOS complex IV (CIV) assembly. Consequently, OXPHOS supercomplexes formation was impaired in both patients, as evidenced by resolving the small supercomplex III+IV by lauryl-maltoside solubilization (Fig.1B) and the large supercomplexes $I+III_2+IV_n$ (SC) by digitonin solubilization (Fig. 1D). We then evaluated whether CHCHD10 could physically interact with mitofilin. We found that CHCHD10 was immunoprecipitated by a rabbit polyclonal anti-mitofilin antibody both in control and patient fibroblasts (Fig.1E). Last, we used a proximity ligation assay (PLA Duolink) to analyze *in situ* the proximity between CHCHD10 and mitofilin comparing control and patient fibroblasts. A similar experimental protocol was applied to study the proximity between CHCHD10 and CHCHD6. PLA experiments resulted in a positive labeling in control cells but quantitative analysis revealed a significant decrease of dot number in patient fibroblasts (Fig.1F). Taken together, these results show that CHCHD10 is an important component of MICOS complex and that *CHCHD10* mutation leads to MICOS complex disassembly.

Decrease in nucleoid number without mtDNA depletion in *CHCHD10* mutant fibroblasts

CHCHD10 mutations lead to MICOS complex disassembly and loss of mitochondrial cristae. It has been suggested that there may be a threshold for the density of cristae junctions

required for the maintenance of nucleoid distribution (Itoh et al., 2013). Based on these observations, we visualized nucleoids in patient cells carrying the p.Ser59Leu mutation to determine whether nucleoid disorganization could be responsible for the defect in mtDNA maintenance that was observed in patient skeletal muscle biopsies (Bannwarth et al., 2014). Immunostaining of control and patient fibroblasts with an anti-DNA antibody revealed a significant decrease of nucleoid number in patient cells compared with control cells (Fig.2A-B). Image analysis revealed no aggregation of nucleoids in patient fibroblasts despite a slight increase of nucleoid surface in cells from the first patient (Fig.2C). The phenotype was confirmed using an anti-TFAM antibody, a main protein component of the nucleoids (supplementary Fig.3). Importantly, total mtDNA content did not decrease in *CHCHD10* mutant fibroblasts (Fig.2D). Thus, the reduction of nucleoid number is not related to a reduction in the amount of mtDNA.

Expression of *CHCHD10* mutations in HeLa cells also leads to a decrease in nucleoid number without mtDNA depletion

To substantiate our findings, we also analyzed nucleoid characteristics in HeLa cells expressing *CHCHD10* mutant alleles. Among 94 FTD-ALS patients, we previously identified two unrelated cases who carried a novel missense mutation (c.100C>T; p.Pro34Ser) (Chaussenot et al., 2014), which was also reported in one Italian patient with sporadic ALS (Ronchi et al., 2015). To confirm the pathogenic role of this mutation, we analyzed, first, the effects of overexpression of the pathogenic allele on the morphology of the mitochondrial network. After transfection with either empty vector or the wild-type allele, Mitotracker staining revealed a filamentous network. Overexpression of mutant $CHCHD10^{P34S}$ altered mitochondrial morphology in transfected cells with a significant fragmentation of the network (supplementary Fig.4). We also looked at the mitochondrial morphology by electron microscopy. Contrary to overexpression of the wild-type allele, the overexpression of the

CHCHD10^{P34S} mutant led to a marked defect of the mitochondrial cristae maintenance characterized by loss and desorganization of cristae morphology (supplementary Fig.5). These results are strikingly similar to those observed when we expressed the p.Ser59Leu *CHCHD10* mutation (Bannwarth et al., 2014). Zhang and colleagues also identified the p.Pro34Ser variant in one Canadian patient with Parkinson's disease and in two cases of Alzheimer's disease among cohorts of 153 and 141 patients, respectively (Zhang et al., 2015) and they suggested that it may be not pathogenic. Our data therefore confirm conclusively the deleterious effect of the p.Pro34Ser variant.

Both p.Ser59Leu and p.Pro34Ser mutations were then expressed in HeLa cells. Immunostaining with anti-DNA or anti-TFAM antibodies showed a similar pattern to that found in patient fibroblasts with a reduction of nucleoid number, but with no aggregation (Fig.3A-C; Supplementary Fig.6). Furthermore, there was no reduction of mtDNA content in cells overexpressing mutant alleles compared with cells overexpressing the wild-type CHCHD10 protein (Fig.3D).

Alteration of nucleoid organization in *CHCHD10* mutant fibroblasts

Mitochondrial DNA molecules are thought to be closely associated with the mitochondrial inner membrane and they are included within the insoluble fraction of mitochondria (Kanki et al., 2004). In order to determine whether *CHCHD10* mutations alter the organization of nucleoids, we tested the distribution of mtDNA in Nonidet P-40 (NP-40) extraction obtained from the mitochondrial fraction of both control and patient fibroblasts. Ratio analysis of mtDNA amplified by qPCR from the supernatant and from the mitochondrial pellet showed that mtDNA was recovered from the particulate fraction in control cells, whereas mtDNA was partially released into the soluble fraction in patient cells. These results are consistent with a disturbed organization of nucleoids (Fig.4A).

The p.Ser59Leu *CHCHD10* mutation does not influence mtDNA copy number but impairs mtDNA repair capacity under conditions of oxidative stress

We tested the influence of the p.Ser59Leu mutation on the mtDNA copy number in patient fibroblasts following exposure to reactive oxygen species (ROS). ROS have been observed to act as a key modulator regulating mtDNA copy number in cells (Hori et al., 2009). We treated both control and patient cells with H_2O_2 and allowed 1, 2 or 4 h to recover before being harvested for DNA isolation. We compared mtDNA copy number by qPCR analysis (Sarzi et al., 2007). As previously reported, during the DNA recovery process, mtDNA copy number decreases over time probably due to mtDNA degradation (Hori et al., 2009). Monitoring of mtDNA level during the recovery time did not reveal any significant difference between control and patient fibroblasts (Fig.4B).

We then investigated whether mtDNA instability observed in patients carrying the p.Ser59Leu *CHCHD10* mutation could be secondary to a failure of mtDNA repair. Fibroblasts from control individual and patients were treated with H_2O_2 to introduce oxidative DNA lesions, followed by incubation to allow DNA repair. Lesions in mtDNA were assessed by gene-specific qPCR-based assay in which base lesions, abasic sites or strand breaks interfere with the amplification of long DNA targets. This validated assay has proven particularly useful in examining mtDNA damage and repair kinetics after H_2O_2 treatment (Santos et al., 2006). Long PCR products (15.6kb) were used and normalization was performed with shorter control amplicons (172bp). Control fibroblasts showed a capacity to repair stress-induced DNA lesions with a 70% recovery observed 4h after H_2O_2 treatment, whereas patient fibroblasts showed a severe mtDNA repair deficiency with less than 40% of recovery occuring 4h after treatment (Fig.4C). These results suggest that *CHCHD10* mutation contributes to mtDNA instability by impairing mtDNA repair capacity after oxidative stress *via* nucleoid disorganization.

***CHCHD10* mutant fibroblasts display no impact on general autophagy rate and they are not defective in the delivery of mitochondria to lysosomes**

The accumulation of mtDNA deletions in skeletal muscle could also be secondary to a failure to clear mitochondria with damaged DNA (Chen et al., 2010). We compared the expression of the autophagy marker LC3B between fibroblasts from patients and controls, in basal conditions and after treatment with chloroquine (Fig.5A). Quantification of LC3B-II/β-tubulin ratio revealed no significant difference between patients and controls (Fig.5B). As expected, chloroquine did not inhibit the expression of LC3B-II because, as a lysosomal inhibitor, it would favor its accumulation. Quantification of the ratio between LC3B-II levels within samples at baseline and after treatment with chloroquine also revealed no difference between patient and control cells (Fig.5C). These results suggest that, under basal conditions, the p.Ser59Leu mutation does not inhibit general autophagy rate in patient fibroblasts. To gain further insight into the effects of the p.Ser59Leu mutation on mitophagy, we monitored the delivery of mitochondria to lysosomes using a biosensor for this process, mt-Keima (Katayama et al., 2011). mt-Keima is a variant of RFP that is fused to a presequence to the mitochondrial matrix. This cellular biomarker changes its fluorescent profile in response to pH and it is resistant to degradation within lysosomes. We infected control and patient fibroblasts using lentiviruses carrying mt-Keima and analyzed the intracellular distribution of mt-Keima by measuring the fluorescence intensity in mitochondria and in lysosomes (Fig.5D). Control and patient fibroblasts showed not significant difference in FL_{lyso}/FL_{mito} ratios suggesting that the p.Ser59Leu mutation does not impact on the delivery of mitochondria to lysosomes in fibroblasts (Fig.5E).

Inhibition of apoptosis and delayed cytochrome *c* release in cells expressing *CHCHD10* mutant alleles

Finally, we investigated whether *CHCHD10* mutations could lead to disease state secondary to disturbed apoptotic mechanisms. Annexin V/DAPI staining was performed in primary fibroblasts isolated from healthy individuals (controls) or from the two patients (V-10 and IV-3) carrying the p.Ser59Leu mutation. Mutant fibroblasts were significantly less sensitive to staurosporine-induced apoptosis compared with controls (Fig.6A). This reduction in annexin V/DAPI staining was associated with a reduction in PARP cleavage and of caspase activation. The latter was visualized with a reduction of the cleaved form of caspase 3 as well as by a decrease in cellular DEVDase activity (Fig.6B-C). These results were confirmed in HeLa cells expressing the WT, $CHCHD10^{S59L}$ or $CHCHD10^{P34S}$ mutant forms (Fig.7A-C). We further observed that mutant fibroblasts did not present a difference in mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi m$) under basal conditions. However, following staurosporine treatment, although the $\Delta\Psi m$ dropped dramatically in control fibroblasts as was expected, mutant cells were less affected (Fig.6D-E). Furthermore, release of cytochrome *c* was delayed following staurosporine in patient fibroblasts compared to control cells (Supplementary Fig.7). These results are in line with the reduction of cell death observed in the mutant fibroblasts.

Then, using HeLa cells expressing the WT, $CHCHD10^{S59L}$ or $CHCHD10^{P34S}$ mutant forms, we showed that this reduction in apoptosis was associated with a reduction in the permeabilization of the outer membrane of the mitochondria (MOMP), whith SMAC degradation being used as a readout of MOMP (Fig.7D) (Tait et al., 2010). The expression of $CHCHD10^{S59L}$ or $CHCHD10^{P34S}$ mutant alleles also delayed cytochrome *c* release compared with HeLa cells expressing wild-type CHCHD10 (Supplementary Fig. 8).

Taken together our experimental data indicate that expression of both the p.Ser59Leu and p.Pro34Ser *CHCHD10* mutations is able to decrease the sensitivity of the cells towards apoptotic stimuli.

DISCUSSION

Recent studies in yeast have identified the mitochondrial inner membrane organizing system (MINOS) complex, which is located within the inner mitochondrial membrane (IMM) (Friedman et al., 2015; von der Malsburg et al., 2011). This complex was recently renamed to MICOS and a nomenclature for its subunits was proposed using the 3 letters Mic followed by the apparent molecular weight of the protein (Pfanner et al., 2014). Mitofilin, newly called Mic60, is a central component of yeast MICOS complex and is associated with at least 5 different other proteins, namely Mic27, Mic26, Mic19, Mic12 and Mic10 (Alkhaja et al., 2012; Harner et al., 2011; Hoppins et al., 2011; Pfanner et al., 2014; von der Malsburg et al., 2011). The core components of MICOS have been highly conserved during evolution. In mammals, only 4 subunits have been demonstrated so far to constitute this complex: MIC60/Mitofilin, MIC27/APOOL, MIC19/CHCHD3 and MIC10/MINOS1. Depletion of mitofilin in human cells or deletion in yeast leads to abnormal cristae structures with a massive loss of cristae junctions (John et al., 2005; Rabl et al., 2009). Destabilization of MICOS also correlates with concomitant loss of cristae junctions, which indicates that the integrity of MICOS is required for the formation and/or maintenance of these structures (Friedman et al., 2015; Zerbes et al., 2012). We had previously shown that *CHCHD10* encodes an intermembrane space mitochondrial protein that is enriched at cristae junctions and, that expression of *CHCHD10* mutant alleles led to abnormal cristae structures with loss of cristae junctions (Bannwarth et al., 2014). Our current study has confirmed these findings by showing that CHCHD10/MIC14 resides with mitofilin/MIC60, CHCHD3/MIC19 and CHCHD6/MIC25 in MICOS complex. The expression of *CHCHD10* mutant alleles results in partial disassembly of the mitofilin/CHCHD3/CHCHD6/CHCHD10 complex, which is the triggering factor that underlies the dramatic alterations in mitochondrial cristae morphology

observed in patient cells. Detachment of cristae from the inner boundary membrane likely leads to a separation of the mitochondrial respiratory chain complexes from the protein import machinery and thus from the supply of substitute proteins that is required for the replacement of damaged subunits (Zerbes et al., 2012). This probably explains at least in part the bioenergetic deficit associated with the expression of *CHCHD10* mutant alleles. Furthermore, loss of mitochondrial cristae junctions may have additional negative effects on the assembly of respiratory chain complexes and the stability of mitochondrial supercomplexes, which are mainly located within cristae membranes. The impairment of complex IV assembly and of supercomplex formation observed in patient fibroblasts supports our hypothesis and this would account, at least partly, for the multiple respiratory chain deficiency observed (Bannwarth et al., 2014).

The accumulation of multiple mtDNA deletions is a characteristic pathological hallmark of disorders of mitochondrial maintenance (Copeland and Longley, 2014). Multiple mtDNA deletions were found in muscle biopsies from patients carrying the p.Ser59Leu mutation and our data show that this is not due to disturbed mitochondrial dynamics as mitochondrial fusion is not inhibited in patient fibroblasts (Bannwarth et al., 2014). Since a minimum density of cristae junctions is thought to be required for the maintenance of nucleoid distribution (Itoh et al., 2013), we analyzed the effects of *CHCHD10* mutations on nucleoid organization. Mitochondrial nucleoids carry 2 to 10 mtDNA molecules packaged with proteins, including mitochondrial transcriptional factor A (TFAM), and they appear to be a platform for transcription, translation, replication and repair of mtDNA (Alam et al., 2003). In human fibroblasts, nucleoids are formed by clusters of small uniform structures consisting of a single copy of mtDNA and with an average of 1184+/-59 nucleoids per cell with DNA antibodies and 964+/-50 nucleoids per cell with TFAM antibodies by confocal microscopy (Kageyama et al., 2014). We found similar results in control fibroblasts but there was a

significant decrease in the number of nucleoids in patient cells. Importantly, total mtDNA content was not decreased both in patient fibroblasts and in HeLa cells overexpressing *CHCHD10* mutant alleles. We observed no enlarged nucleoids that could explain the reduction of nucleoid number, a phenomenon that has been reported previously in the context of Drp-1-mediated mitochondrial fission defects (Ban-Ishihara et al., 2013). In *CHCHD10* mutant fibroblasts, the decrease in nucleoid number is likely secondary to their physical disorganization in relation to the inner mitochondrial membrane. Indeed, nucleoids are mainly membrane associated and most mtDNA is recovered in the particulate insoluble fraction when extracted from normal mitochondria with NP-40 (Alam et al., 2003). However, when isolated from *CHCHD10* mutant fibroblasts, mtDNA was partially released into the soluble fraction indicating that the organization of the mitochondrial nucleoids has been altered. This disorganization is likely to have a serious impact on mtDNA repair mechanisms, especially under conditions of oxidative stress, and it is an attractive mechanism that would explain the accumulation of multiple mtDNA deletions in skeletal muscle of patients harboring pathogenic *CHCHD10* mutations. The CHCHD10 protein resides in the MICOS complex with mitofilin, which has also been identified in nucleoid isolation experiments (Jans et al., 2013; Wang and Bogenhagen, 2006). One could therefore speculate that *CHCHD10* mutations are responsible for nucleoid disorganization *via* MICOS complex destabilization and the subsequent loss of cristae junctions.

Mitochondrial autophagy is a protective mechanism that allows for the removal of mitochondria habouring high levels of mtDNA damage (Meyer and Bess, 2012). It is therefore conceivable that deficient mitophagy is another mechanism contributing to the mtDNA instability associated with pathogenic *CHCHD10* mutations. We found no impact on general autophagy rate in patient fibroblasts and importantly, there was no impaired delivery of mitochondria to lysosomes. The presence of abnormal protein aggregates or inclusions

containing specific misfolded proteins is a common feature of most neurodegenerative disorders. Many studies in cellular and animal models of motor neuron disease indicate an enhanced autophagy activity (Nassif et al., 2010). However, mutations in 2 genes associated with ALS, charged multivesicular body protein-2B (*CHMP2B*) and the lipid phosphatase Fig4 (*FIG4*) lead to severe impairment of the autophagic pathway, strengthening the hypothesis that autophagy defect may contribute to ALS (Ferguson et al., 2009; Lee et al., 2007). Furthermore, impairment of the ubiquitin-proteasome system, but not the autophagy-lysosome system, in motor neuron replicates ALS in mice (Tashiro et al., 2012). These contrasting observations on the role of autophagy in ALS are perhaps not surprising as ultimately, the same neurodegenerative disorder can be the consequence of diverse pathological pathways, depending largely on the predominant genetic defect driving cellular dysfunction and neuronal loss. Although further experiments in mouse and other cellular models are necessary, our results suggest that the mtDNA instability observed in skeletal muscle of patients carrying the *CHCHD10* p.Ser59Leu mutation is not associated with impaired mitophagy.

Since mitochondrial cristae sequester the bulk of cytochrome *c* molecules, we also explored the impact of *CHCHD10* mutations on apoptosis. The expression of wild-type CHCHD10 does not protect HeLa cells from apoptosis induced by Actinomycin D. Surprisingly, expression of $CHCHD10^{S59L}$ or $CHCHD10^{P34S}$ mutant forms leads to a significant reduction in cell death. In keeping with this observation, patient fibroblasts carrying the p.Ser59Leu mutation were significantly less sensitive to staurosporine-induced apoptosis compared with control cells. While excessive apoptosis has been associated with neurodegenerative disorders, as one would expect, it is becoming abundately clear that apoptosis is not the only cellular mechanism that regulates cell death and drives neuronal loss (Agostini et al., 2011; Pirooznia et al., 2014). Re and colleagues reported that human adult

astrocytes, which have been derived from motor cortex and spinal cord of sporadic ALS patients, have a deleterious influence on human embryonic stem-cell-derived motor neurons by triggering a form of regulated necrosis, termed necroptosis, in the absence of caspase activation (Re et al., 2014). The wobbler mouse is one of the best-characterized model of spontaneous motor neuron degeneration and it mimics several of the key features seen in ALS patients (Moser et al., 2013). Several studies suggest that motor neuron death occuring in these mice is not related to caspase-dependent apoptotic mechanisms (Ballinger et al., 1999; Popper et al., 1997). Lastly, "dying-back" mechanism where distal axon degeneration occurs early during the disease, before neuronal degeneration and the onset of overt clinical symptoms, has been reported in mouse models and patients with ALS (Dadon-Nachum et al., 2011). Nevertheless, the observation that the disassembly of MICOS complex linked to *CHCHD10* mutations should lead to protection against apoptosis *via* cristae alteration is surprising. During development, about 50% of all neurons undergo programmed cell death (PCD), a process that is critical for the establishment and maturation of a definitive pattern of neuronal connections (Yeo and Gautier, 2004). Apoptosis is also responsible for focal elimination of cells within differentiated neuronal populations and PCD appears to be critical for cell number control, quality control and phenotypic selection. *CHCHD10* is the first gene responsible for FTD-ALS clinical spectrum and SMAJ that encodes for a primary mitochondrial protein. Although further work is needed in this area, it is tempting to speculate that *CHCHD10* mutations could negatively impact upon PCD resulting in an impaired ability to eliminate dysfunctional neurons, which in turn perpetuate a negative spiral of cell degeneration *via* caspase-independent mechanisms.

In conclusion, this is the first report establishing a causative link between mutations in a gene encoding for a component of the MICOS complex and human disease. Disassembly of the MICOS complex secondary to *CHCHD10* mutations leads to mitochondrial dysfunction

including loss of mitochondrial cristae, respiratory chain deficiency, nucleoid disorganization with impaired mtDNA repair and inhibition of apoptosis (Fig.8). The pathological manifestations associated with *CHCHD10* mutations provide a unique opportunity to gain further insight into the complex cellular pathways linking mitochondrial dysfuntion with the broader area of neurodegeneration.

MATERIALS AND METHODS

Confocal microscopy analysis

For mitochondrial staining, cells were incubated in a 100nM solution of Mitotracker red (Invitrogen) for 15 min, medium was replaced by fibroblasts or HeLa cells culture medium incubated 2 h at 37°C and washed in PBS. The samples were fixed with paraformaldehyde (PFA) 4% (Electron Microscopy Sciences) for 20 min at 37°C, washed with PBS, and mounted on glass slides using Prolong Gold Antifade Reagent (Molecular Probes). For immunostaining, cells were fixed with 4% PFA, washed five times with PBS and permeabilised with 2% Triton X-100. After PBS washing, coverslips were incubated with 5% Bovin Serum Albumin (BSA) for at least 45 min at room temperature (RT) before adding rabbit anti-FlagM2 (Cell Signaling) (1/800 antibody diluted with PBS-BSA 5%), mouse anti-DNA (Progen) (1/200 antibody diluted with PBS-BSA 5%), mouse anti-TFAM (Abnova) (1/500 antibody diluted with PBS-BSA 5%) or mouse anti-cytochrome *c* conjugated with Alexa 488 (BD Biosciences) (1/200 antibody diluted with PBS-BSA 5%). The samples were incubated at RT for 1h, PBS washed, and then incubated with fluorescent secondary antibody goat anti-mouse Alexa 488 (Life Technologies) (1/1000 antibody diluted with PBS-BSA 1%) or antibody goat anti-rabbit Alexa 647 (Life Technologies) (1/1000 antibody diluted with PBS-BSA 1%) for 1h at RT. The coverslips were washed five times with PBS, mounted on

glass slides using Prolong Gold Antifade Reagent (Molecular Probes) and analyzed using a Zeiss LSM510 meta confocal laser-scanning microscope.

Mitochondrial network and nucleoid analysis

The images were deconvolved with Huygens Essential Software™ (Scientific Volume Imaging) using a theoretically calculated point spread function (PSF) for each of the dyes. All selected images were iteratively deconvolved with a maximum iterations scored 40 and a quality threshold at 0.05. The deconvolved images were analysed with Huygens Essentiel Software™ with the following standardised set of parameters: threshold = 25% and seed = 0% and garbage = 5 or 10 in both fibroblasts and HeLa cells for mitochondrial network analysis; threshold = 5%, seed = 5% and garbage = 5 in both fibroblasts and HeLa cells for nucleoid analysis. The quantitative data were further analysed in Microsoft Excel and GraphPad Prism 5 (GraphPad Software). Mitochondrial network length and nucleoid parameters were quantified for three independent experiments (30-35 randomly-selected individual cells per experiment). Data are represented as mean ± S.E.M. Statistical analyses were performed by Student's unpaired t-test using GraphPad Prism 5 (GraphPad Software).

In situ proximity ligation assay (PLA)

Fibroblasts were seeded in 16-well Lab-Tek chambers slides (Nunc). For mitochondrial staining and after an attachment period of 48h, cells were incubated in a 100nM solution of Mitotracker red for 15 min. Then the samples were washed twice with PBS and fixed with PFA 4% for 20 min at 37°C, washed five times with PBS and permeabilised with 2% Triton X-100 for 10 min. After five PBS washes, coverslips were saturated with 5% BSA for 45 min at RT. The following antibodies were used in PLA assay: rabbit anti-CHCHD10 (Sigma), mouse anti-mitofilin (Abcam) or rabbit anti-mitofilin (Proteintech) and goat anti-CHCHD6 (Santa Cruz). All antibodies were diluted (1/200) with PBS-BSA 5%. Fibroblasts were incubated in the presence of convenient couple of primary antibodies for 1h at RT. After two

PBS washes, incubation with appropriate PLA probe (PLA probe anti-rabbit MINUS, PLA probe anti-mouse PLUS or PLA probe anti-goat PLUS), hybridization, ligation and amplification were done using the DuoLink *In Situ* Detection Reagents Green (Olink Biosciences) following manufacturer's instructions. Finally, the samples were mounted on glass slides using Prolong Gold Antifade Reagent (Molecular Probes) and analyzed using a DeltaVision Imaging System (GE Healthcare Life Sciences). Data are represented as mean ± S.E.M. Statistical analyses were performed by Student's unpaired t-test using GraphPad Prism 5 (GraphPad Software). Negative control experiments (with one antibody omitted) were performed in parallel and checked to result in the absence of PLA signal.

Blue native electrophoresis (BN-PAGE)

Mitochondrial membranes were isolated from $2.5x10^6$ cells or from 200µg of pure mitochondria as described previously (Nijtmans et al., 2002). Cells were solubilized with 3% digitonin (wt/vol) (Sigma-Aldrich) and 0.4% (wt/vol) lauryl maltoside (Sigma-Aldrich) or 1% digitonin (wt/vol). Pure mitochondria were solubilized with two rounds of digitonin (8g/g and 4g/g of protein). Ten microliters of samples were electrophoresed on a 5–13% gradient polyacrylamide gel as described previously (Nijtmans et al., 2002). Transfer of proteins onto a PVDF membrane (Bio-Rad Laboratories) was carried out overnight at 30 V at 4°C. For second-dimension gel electrophoresis, a lane excised from the first dimension native gel was first treated for 30 min with denaturing buffer containing 15mM β–mercaptoethanol and 1% SDS and then washed in 1% SDS for 1 h. The gel strip was electrophoresed on a tricine-SDS-polyacrylamide gel as described previously (Ballinger et al., 1999).

For supercomplexe analysis, enriched mitochondrial fraction was solubilized with 6g/g digitonin. 30 µg proteins were loaded to a 4-13% Bis-Tris Native gel. Electrophoresis run at 4mA during 23h. Proteins were transferred at 63mA for 24h to a PVDF membrane.

Preparation of mitochondrial NP-40-soluble and insoluble fractions

Mitochondria were isolated using Q-Proteome mitochondria isolation kit (Qiagen) as described by the manufacturer. All solutions contained 1X concentration of protease inhibitor mix, CompleteMini™ (Roche). Mitochondria (5mg/ml) were solubilized in TES buffer (0.25M sucrose, 10mM Tris-HCl, pH 7.0 and 1mM EDTA) containing 0.5% NP-40. After incubation for 30min at 4°C with shaking, the mitochondria were centrifuged for 30min at 10.000xg at 4°C and separated into supernatant (S) and pellet (P). The pellet was resuspended in the same solubilizing buffer and was centrifuged 30min at 10.000xg at 4°C for a second wash.

mtDNA quantification by qPCR in total mitochondria, P and S fractions

Briefly, 10µl of samples were mixed with 10µl of 2X digestion buffer (100mM Tris-HCl, pH8.0, 2mM EDTA, 2% SDS and 2mg/ml proteinase K) and incubated 30min at 55°C. After addition of 180µl of distilled water, the mixtures were further incubated for 10min at 100°C to inactivate proteinase K. Samples were diluted 10-fold with distilled water. Relative mtDNA quantification of mtDNA fragment (nucleotides 1195-1305) was performed by qPCR. PCR reaction mixture (20µl) contained 4µl of DNA samples, 1X LightCycler 480 probes master mix (Roche), 6µM of 12S taqman probe (5'-6FAM-AAACCCCGATCAACC-3'MGBNFQ) and 0.3 nM of each primer (5'-TAGAGGAGCCTGTTCTGTAATCGA-3' (forward) and 5'-TGCGCTTACTTTGTAGCCTTCAT-3' (reverse)). PCR amplification, performed in a Light Cycler LC480 apparatus, consisted of a single denaturation-enzyme activation step for 10min at 95°C, followed by 45 amplification cycles of 15sec at 95°C and 40sec at 60°C. A single acquisition was done at the end of each annealing step, and data were analyzed using LightCycler software version 1.5.0.39 (Roche).

Autophagy analysis

Autophagy was assessed by western blot analysis of the autophagosome marker LC3B-II (1/500, Cell Signaling), which correlates with the number of autophagosomes. Anti-β-tubulin

(1/2000, Abcam) antibodies were used for normalization. Autophagic flux, that defines the entire autophagy dynamic process, was assessed by the ratio of LC3B-II between samples in the presence and absence of chloroquine, an autophagy inhibitor. Cells were exposed to chloroquine (10μM) for 2 h prior to analysis with western blot. Densitometry was performed using ImageJ software (National Institute of Health).

Mitophagy analysis

Fibroblast cells were infected with lentiviruses expressing mt-Keima and observed with a dual excitation imaging system using Zeiss LSM 510 with a 60X objective lens. Images were taken at 3 days post infection (Kageyama et al., 2014; Katayama et al., 2011). Excitation 458 nm and emission > 650 nm were used to detect mt-Keima in mitochondria in the cytosol (FL_{mito}, green). Excitation 561nm and emission > 650nm were used to detect mitochondria in the lysosomes (FL_{lyso}, red). mt-Keima signals in mitochondria and those in lysosomes were measured in whole cells. Background fluorescence was calculated in 3 independent positions in the cell, averaged and subtracted from the whole cell fluorescence using the NIH Image J software. The ratio of fluorescent intensity FL_{lyso}/FL_{mito} was quantified. Values are mean ± SEM (n = 3 experiments). ~10 cells were analyzed in each experiment. Two tailed t-test were performed. P values were not significant for both patient cells compared to control cells.

Cell death measurement

Cells were treated either with 1μM Staurosporine (Sigma Aldrich) or with 1μM Actinomycine D (Sigma Aldrich) as indicated, re-suspended in 200μl of buffer (150 mM NaCl, 10 mM HEPES, 5 mM KCl, 1 mM $MgCl_2$, 1.8 mM $CaCl_2$) and incubated with annexin V-FITC (BD Biosciences) for 10 min at RT. A volume of 0.5 μg/ml of DAPI (Molecular Probes) was then added, and samples were analyzed immediately by flow cytometry using a MACS-Quant Analyzer (Miltenyi Biotec). Anti-Hsp90 antibody (Enzo Life Sciences), anti-

PARP, anti-Caspase 3 and anti-Smac antibodies from Cell Signaling Technology were used for western blotting.

DEVDase activity

A total of 20µg of protein (in triplicate) was incubated with 0.2mM of Ac-DEVD-AMC in 50mM HEPES pH 8; 150mM NaCl; 20mM ethylenediaminetetraacetic acid ± 1µM Ac-DEVD-CHO. Caspase activity was determined at 460 nm, and specific activities were expressed in ΔOD per minute and per milligrams of protein.

Mitochondrial membrane potential (ΔΨM) measurement

The transmembrane potential of mitochondria was analyzed with the potential-dependent fluorescent dye TMRE (Molecular Probes/Life Technologies). TMRE was used to label active mitochondria and to determine the mitochondrial membrane potential based on the fluorescence intensity of the TMRE sequestered by the mitochondria. Briefly, patient fibroblast cells were plated in 24-well plates. The cells were treated with 1µM Staurosporine for 24 h. The cells were then incubated with 100nM TMRE for 10 min at 37 °C in the dark. The fluorescence intensity produced by the TMRE was measured by flow cytometry using a MACS-Quant Analyzer (Miltenyi Biotec). Laser excitation of TMRE was at 549 nm and emission was read at 575 nm.

ACKNOWLEDGEMENTS

We acknowledge Pasteur-IRCAN Cellular and Molecular Imaging platform (PICMI).

AUTHOR CONTRIBUTIONS

E.C.G., M.P., S.B., K.F., F.L. designed and performed experiments, analysed data and contributed to the main text; G.A. performed experiments; E.V. performed and analyzed apoptosis experiments; J-ER. designed and analyzed apoptosis experiments and contributed to the main text; E.C-B., B.O-V., E.P-M. performed and analyzed MICOS experiments; C.V-B.

performed and analyzed MICOS experiments and contributed to the main text; M.R., Y.K. performed and analyzed mitophagy experiments; H.S. analyzed mitophagy experiments and contributed to the main text; D.M., F.B. performed and analyzed autophagy experiments; P.Y-W-M. analyzed mitophagy experiments and contributed to the main text; S.L-G. performed electron microscopy experiments; V.P-F. supervised the project and wrote the manuscript.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no competing financial interests.

FUNDING

This work was made possible by grants to V.P-F from the Fondation pour la Recherche Médicale (FRM), to H.S from National Institutes of Health (GM089853) and to JE.R from la Fondation ARC pour la Recherche sur le Cancer. P.YWM is supported by a Clinician Scientist Fellowship Award (G1002570) from the Medical Research Council (UK) and also receives funding from Fight for Sight (UK) and the UK National Institute of Health Research (NIHR) as part of the Rare Diseases Translational Research Collaboration. C.V-B is supported by the Spanish Instituto de Salud Carlos III (CP11/00046). M.P is granted by an FRM fellowship (DEA20130727390).

SUPPLEMENTARY MATERIAL

Cell culture

Skin punches were obtained after informed consent. Primary fibroblast cultures were established using standard procedures in RPMI supplemented with 10% Fetal Bovine Serum (FBS), 45µg/ml uridine and 275µg/ml sodium pyruvate. Cultures were incubated at 37°C with 5% CO_2. For galactose conditions, medium was replaced 24h before experiments by glucose-free medium containing 5mM galactose and 5mM pyruvate (Zanna et al., 2008).

HeLa cells were maintained in DMEM supplemented with penicillin (100U/ml)/streptomycin (0.1mg/ml), 10% FBS, at 37°C in a humidified atmosphere with 5% CO_2 in air. For transient transfections, HeLa cells were transfected using Lipofectamine 2000 (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions.

OXPHOS spectrophotometric measurements

Enzymatic spectrophotometric measurements of the OXPHOS respiratory chain complexes and citrate synthase were performed at 37°C on fibroblasts according to standard procedures (Rustin et al., 1994).

Plasmid constructions

Flag-tagged CHCHD10 plasmids coding for wild-type ($CHCHD10^{WT}$) and mutant ($CHCHD10^{S59L}$) cDNAs were previously described (Bannwarth et al., 2014). The $CHCHD10^{P34S}$ plasmid has been generated using the QuickChange-XL Site-Directed Mutagenesis kit (Agilent) from pCMV-3Tag-3A-$CHCHD10^{WT}$ with following primers: 5'-GGCAGCCGCCTCAGCCCCCGC-3' (forward) and 5'-GCGGGGGCTGAGGCGGCTGCC-3' (reverse). All constructs were verified by DNA sequencing.

Immunoelectron microscopy

Cells were fixed with 2% paraformaldehyde, 0.2% glutaraldehyde in 0.1 M phosphate buffer (pH 7.4) for 2h and were processed for ultracryomicrotomy according to a slightly modified Tokuyasu method (Tokuyasu, 1973). In brief, cell suspension was spun down in 10% gelatin. After immersion in 2.3 M sucrose (in [pH 7.4], 0.1 M PB) overnight at 4°C, the samples were rapidly frozen in liquid nitrogen. Ultrathin (70 nm thick) cryosections were prepared with an ultracryomicrotome (Leica EMFCS) and mounted on formvar-coated nickel grids (Electron Microscopy Sciences).

Mitochondrial fusion assay

Mitochondrial fusion was examined using mitochondria-targeted photoactivatable GFP (mitoPAGFP), as described (Karbowski et al., 2004). The matrix-targeted presequence from Su9 (Wakabayashi et al., 2009) was fused to the N-terminus of photoactivatable GFP (Addgene) and cloned into the lentiviral vector pHR-SIN (Kim et al., 2011). Fibroblasts were infected with lentiviral particles carrying mitoPAGFP 30 min before observation and were stained with 7nM tetramethylrhodamine ethyl ester to visualize mitochondria. MitoPAGFP was photoactivated by 405-nm light (30% power, three times) in a small region (30 x 30 pixels) using a Zeiss 780 LSM confocal microscope with an environmentally controlled chamber. Images were taken at 15-min intervals for 60 min. Fluorescence intensity of mitoPAGFP was quantified using NIH Image J for at least three independent experiments. Data are represented as mean ± S.E.M. Statistical analyses were performed by Student's unpaired t-test.

Co-immunoprecipitation experiments

Fibroblasts were homogenized in solubilization buffer (50 mM Tris-HCl pH7.4, 150 mM NaCl, 0.1% Triton and protease inhibitor (Roche)) and incubated on ice for 1h. A centrifugation for 5 min at 2600 g and 4°C was performed and the cell lysate obtained was incubated with Dynabeads® M-270 Epoxy (Life technologies) for 1 h at 4°C with gentle rotation. After this pre-clearing step, lysate was incubated ON at 4°C with gentle rotation with rabbit polyclonal anti-mitofilin antibody (Abcam), previously coupled to Dynabeads® M-270 Epoxy using Dynabeads® Co-Immunoprecipitation Kit (Life Technologies) as described by the manufacturer. After the incubation with the cell lysate, beads were washed three times with wash buffer (20 mM Tris-HCl pH7.4, 50 mM NaCl, 0.5 mM EDTA, 10% glycerol, 0.15% digitonin, 1 mM PMSF) and bound proteins were released with Laemmli buffer. Immunoprecipitated proteins were separated on acrylamide-SDS gels and transferred to PVDF membranes (Millipore). The membrane was probed with rabbit anti-CHCHD10 (1/500,

Sigma) antibody, with mouse anti-Mitofilin antibody (1/500, Abcam) and with mouse anti-PCNA antibody (1/5000, BD Biosciences), a nuclear protein as negative control. Then, the appropriate secondary antibody (Dako) was used at 1/5000 and signals were detected using a chemiluminescence system (Immobilon Western HRP Chemilumiscent substrates, Millipore).

Treatment of cells with H_2O_2

Primary fibroblasts were plated in triplicate in 100mm-diameter culture sterile dishes at 60-70% confluence 20h before treatment. H_2O_2 (30%, Sigma Aldrich, St Quentin Fallavier, France) was diluted into PBS and the concentration was determined by absorbance at 260nm as described (Shull et al., 1991). Monolayer cultures were exposed to 150µM H_2O_2 for 30 min at 37°C in serum free medium. Medium culture was replaced by complete medium culture and incubated for the indicated times. Control monolayers were mocked-treated with corresponding serum free medium alone (Yakes and Van Houten, 1997). Before genomic DNA extraction, medium culture was removed and plates were rapidly frozen in liquid N_2 and stored at -80°C.

DNA damage and repair assays

Measurement of mtDNA damage was performed using quantitative PCR (qPCR) that amplifies long DNA targets. The assay was performed essentially as described previously (Hunter et al., 2010; Santos et al., 2006). DNA lesions, including H_2O_2-induced damage, block the progression of the Taq DNA polymerase resulting in a decreased amplification of a target sequence (Ballinger et al., 1999; Yakes and Van Houten, 1997). For the PCR to be quantitative, it is necessary to amplify a given amount of template at a cycle number that is within exponential range of the PCR. Therefore, for each sample, 3 separate PCR reactions were performed with 3 different cycle numbers to determine quantitative conditions. PCR conditions are available on request and the following primers were used to amplify a 15.6kb

fragment of human mtDNA (sense primer 5'-CCC ACA GTT TAT GTA GCT TAC CTC CTC A-3' and reverse primer 5'-TTG ATT GCT GTA CTT GCT TGT AAG CAT G -3').

PCR quantification was normalized with a small target PCR not affected by H_2O_2 treatment. A human 172bp mtDNA fragment was amplified using a sense primer (5'-GAA TTG TGT AGG CGA ATA GG- 3') and a reverse primer (5'-CTA CAC AAT CAA AGA CGC CC-3'). All PCR reactions were quantified using Quant-iT PicoGreen dsDNA reagent (Invitrogen) which becomes fluorescent upon binding to DNA. 5µl of each PCR reaction were diluted in TE buffer 1X (45µl) containing 1X Quant-iT PicoGreen dsDNA reagent. Standard curve was performed as described by the manufacturer. Fluorescence quantification was performed with a LightCycler LC480 apparatus. Relative PCR products of mtDNA were normalized to mtDNA copy number. The relative PCR product, which represents the relative level of oxydative DNA damage, was calculated by dividing the raw fluorescence value of a H_2O_2-treated sample by that of the corresponding H_2O_2-untreated sample.

mtDNA copy number

The mtDNA content was determined by real-time PCR using TaqMan probes as previously described (Bannwarth et al., 2012). The ratio of mtDNA copy number to nuclear DNA was used as a measure of mtDNA content in each specimen.

Western blot analysis

5-25 µg of total protein extracts were separated on acrylamide-SDS gels and transferred to PVDF membranes (Millipore). Specific proteins were detected by using mouse anti-Flag M2 (1/1000, Cell Signaling) and anti-GAPDH (1/10000, Abcam) antibodies. Anti-mouse secondary antibodies (Dako) were used at 1/10000 and signals were detected using a chemiluminescence system (Immobilon Western HRP Chemilumiscent substrates, Millipore).

REFERENCES

Agostini M, Tucci P, Melino, G. (2011) Cell death pathology: perspective for human diseases. Biochem. Biophys. Res. Commun. 414: 451-455.

Alam TI, Kanki T, Muta T, Ukaji K, Abe Y, Nakayama H, Takio K, Hamasaki N and Kang D. (2003) Human mitochondrial DNA is packaged with TFAM. Nucleic Acids Res 3: 1640-1645.

Alkhaja AK, Jans DC, Nikolov M, Vukotic M, Lytovchenko O, Ludewig F, Schliebs W, Riedel D, Urlaub H, Jakobs S, Deckers M (2012) MINOS1 is a conserved component of mitofilin complexes and required for mitochondrial function and cristae organization. Mol Biol Cell 23: 247-257.

Auranen M, Ylikallio E, Shcherbii M, Paetau A, Kiuru-Enari S, Toppila JP, Tyynismaa H. (2015) *CHCHD10* variant p.(Gly66Val) causes axonal Charcot-Marie-Tooth disease. Neurol Genet 1e1 doi:10.212/NXG.0000000000000003.

Ballinger SW, Van Houten B, Jin GF, Conklin CA, Godley BF (1999) Hydrogen peroxide causes significant mtDNA damage in human RPE cells. Exp Eyes Res 68 : 765-772.

Ban-Ishihara R, Ishihara T, Sasaki N, Mihara K, Ishihara N (2013) Dynamics of nucleoid structure regulated by mitochondrial fission contributes to cristae reformation and release of cytochrome c. Proc Natl Acad Sci U S A 110: 11863-11868.

Bannwarth S, Ait-El-Mkadem S, Chaussenot A, Genin EC, Lacas-Gervais S, Fragaki K, Berg-Alonso L, Kageyama Y, Serre V, Moore DG, Verschueren A, Rouzier C, Le Ber I, Augé G, Cochaud C, Lespinasse F, N'Guyen K, de Septenville A, Brice A, Yu-Wai-Man P, Sesaki H, Pouget J, Paquis-Flucklinger V (2014) A mitochondrial origin for frontotemporal dementia and amyotrophic lateral sclerosis through *CHCHD10* involvement. Brain 137: 2329-2345.

Bannwarth S, Figueroa A, Fragaki K, Destroismaisons L, Lacas-Gervais S, Lespinasse F, Vandenbos F, Pradelli LA, Ricci JE, Rötig A, Michiels JF, Vande Velde C, Paquis-Flucklinger V (2012) The human MSH5 (MutSHomolog 5) protein localizes to mitochondria and protects the mitochondrial genome from oxidative damage. Mitochondrion 12: 654-665.

Chaussenot A, Le Ber I, Ait-El-Mkadem S, Camuzat A, de Septenville A, Bannwarth S, Genin EC, Serre V, Augé G, French research network on FTD and FTD-ALS, Brice A, Pouget J, Paquis-Flucklinger V (2014) Screening of *CHCHD10* in a French cohort confirms the involvement of this gene in frontotemporal dementia with amyotrophic lateral sclerosis patients. Neurobiol Aging 35: 2884.e2881-2884.

Chen H, Vermulst M, Wang YE, Chomyn A, Prolla TA, McCaffery JM, Chan DC (2010) Mitochondrial fusion is required for mtDNA stability in skeletal muscle and tolerance of mtDNA mutations. Cell 141: 280-289.

Chiò A, Mora G, Sabatelli M, Caponnetto C, Traynor BJ, Johnson JO, Nalls MA, Calvo A, Mmoglia C, Borghero G, Monsurrò MR, La Bella V, Volanti P, Simone I, Salvi F, Logullo FO, Nilo R, Battistini S, Mandrioli J, Tanel R, Murru MR, Mandich P, Zollino M, Conforti FL, Consortium I, Brunetti M, Barberis M, Restagno G, Penco S, Lunetta C (2015) *CHCHD10* mutations in an Italian cohort of familial and sporadic amyotrophic lateral sclerosis patients. Neurobiol Aging Apr;36(4):1767.e3-6., doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2015.1001.1017.

Copeland WC, Longley MJ (2014) Mitochondrial genome maintenance in health and disease. DNA Repair 19: 190-198.

Dadon-Nachum M, Melamed E, Offen D. (2011) The "dying-back" phenomenon of motor neurons in ALS. J Mol Neurosci 43: 470-477.

Ferguson CJ, Lenk GM, Meisler MH (2009) Defective autophagy in neurons and astrocytes from mice deficient in PI(3,5)P2. Hum Mol Genet 18: 4868-4878.

Friedman JR, Mourier A, Yamada J, McCaffery JM, Nunnari J (2015) MICOS coordinates with respiratory complexes and lipids to establish mitochondrial inner membrane architecture. Elife Apr 28;4. doi: 10.7554/eLife.07739.

Harner M, Körner C, Walther D, Mokranjac D, Kaesmacher J, Welsch U, Griffith J, Mann M, Reggiori F, Neupert W (2011) The mitochondrial contact site complex, a determinant of mitochondrial architecture. EMBO J 30: 4356-4370.

Hoppins S, Collins SR, Cassidy-Stone A, Hummel E, Devay RM, Lackner LL, Westermann B, Schuldiner M, Weissman JS, Nunnari J (2011) A mitochondrial-focused genetic interaction map reveals a scaffold-like complex required for inner membrane organization in mitochondria. J Cell Biol 195: 323-340.

Hori A, Yoshida M, Shibata T, Ling F. (2009) Reactive oxygen species regulate DNA copy number in isolated yeast mitochondria by triggering recombination-mediated replication. Nucleic Acids Res 37: 749-761.

Hunter SE, Jung D, Di Giulio RT, Meyer JN (2010) The QPCR assay for analysis of mitochondrial DNA damage, repair, and relative copy number. Methods 51: 444-451.

Itoh K, Tamura Y, Iijima M, Sesaki H (2013) Effects of Fcj1-Mos1 and mitochondrial division on aggregation of mitochondrial DNA nucleoids and organelle morphology. Mol Biol Cell 24: 1842-1851.

Jans DC, Wurm CA, Riedel D, Wenzel D, Stagge F, Deckers M, Rehling P, Jakobs S. (2013) STED super-resolution microscopy reveals an array of MINOS clusters along human mitochondria. Proc Natl Acad Sci U S A 110 :8936-8941.

John GB, Shang Y, Li L, Renken C, Mannella CA, Selker JM, Rangell L, Bennett MJ, Zha J (2005) The mitochondrial inner membrane protein mitofilin controls cristae morphology. Mol Biol Cell 16: 1543-1554.

Johnson JO, Glynn SM, Gibbs JR, Nalls MA, Sabatelli M, Restagno G, Drory VE, Chiò A, Rogaeva E, Traynor BJ (2014) Mutations in the *CHCHD10* gene are a common cause of familial amyotrophic lateral sclerosis. Brain 137: e311.

Kageyama Y, Hoshijima M, Seo K, Bedja D, Sysa-Shah P, Andrabi SA, Chen W, Höke A, Dawson VL, Dawson TM, Gabrielson K, Kass DA, Iijima M, Sesaki H (2014) Parkin-independent mitophagy requires Drp1 and maintains the integrity of mammalian heart and brain. EMBO J 33: 2798-2813.

Kanki T, Nakayama H, Sasaki N, Takio K, Alam TI, Hamasaki N, Kang D (2004) Mitochondrial nucleoid and transcription factor A. Ann N Y Acad Sci 1011: 61-68.

Karbowski M, Arnoult D, Chen H, Chan DC, Smith CL, Youle RJ (2004) Quantitation of mitochondrial dynamics by photolabeling of individual organelles shows that mitochondrial fusion is blocked during the Bax activation phase of apoptosis. J Cell Biol 164: 493-499.

Katayama H, Kogure T, Mizushima N, Yoshimori T, Miyawaki A (2011) A sensitive and quantitative technique for detecting autophagic events based on lysosomal delivery. Chem Biol 18: 1042-1052.

Kim JS, Xu X, Li H, Solomon D, Lane WS, Jin T, Waldman T. (2011) Mechanistic analysis of a DNA damage-induced, PTEN-dependent size checkpoint in human cells. Mol Cell Biol 31: 2756-2771.

Kurzwelly D, Krüger S, Biskup S, Heneka MT (2015) A distinct clinical phenotype in a German kindred with motor neuron disease carrying a *CHCHD10* mutation. Brain: pii: awv014.

Lee JA, Beigneux A, Ahmad ST, Young G, Gao FB (2007) ESCRT-III dysfunction causes autophagosome accumulation and neurodegeneration. Curr Biol 17: 1561-1567.

Meyer JN, Bess AS (2012) Involvement of autophagy and mitochondrial dynamics in determining the fate and effects of irreparable mitochondrial DNA damage. Autophagy 8: 1822-1823.

Moser JM, Bigini P, Schmitt-John T (2013) The wobbler mouse, an ALS animal model. Mol Genet Genomics 288: 207-229.

Müller K, Andersen PM, Hübers A, Marroquin N, Volk AE, Danzer KM, Meitinger T, Ludolph AC, Strom,TM, Weishaupt JH (2014) Two novel mutations in conserved codons indicate that *CHCHD10* is a gene associated with motor neuron disease. Brain 137: e309.

Nassif M, Matus S, Castillo K, Hetz C (2010) Amyotrophic lateral sclerosis pathogenesis: a journey through the secretory pathway. Antioxid Redox Signal 13: 1955-1989.

Nijtmans LG, Henderson NS, Holt IJ (2002) Blue Native electrophoresis to study mitochondrial and other protein complexes. Methods 26: 327-334.

Penttilä S, Jokela M, Bouquin H, Saukkonen AM, Toivanen J, Udd B (2015) Late onset spinal motor neuronopathy is caused by mutation in *CHCHD10*. Ann Neurol 77: 163-172.

Pfanner N, van der Laan M, Amati P, Capaldi RA, Caudy AA, Chacinska A, Darshi M, Deckers M, Hoppins S, Icho T, Jakobs S, Ji J, Kozjak-Pavlovic V, Meisinger C, Odgren PR, Park SK, Rehling P, Reichert AS, Sheikh MS, Taylor SS, Tsuchida N, van der Bliek AM, van der Klei IJ, Weissman JS, Westermann B, Zha J, Neupert W, Nunnari J (2014) Uniform nomenclature for the mitochondrial contact site and cristae organizing system. J Cell Biol 204: 1083-1086.

Pirooznia SK, Dawson VL, Dawson TM (2014) Motor neuron death in ALS: programmed by astrocytes? Neuron 81: 961-963.

Popper P, Farber DB, Micevych PE, Minoofar K, Bronstein JM (1997) TRPM-2 expression and tunel staining in neurodegenerative diseases: studies in wobbler and rd mice. Exp Neurol 143: 246-254.

Rabl R, Soubannier V, Scholz R, Vogel F, Mendl N, Vasiljev-Neumeyer A, Körner C, Jagasia R, Keil T, Baumeister W, Cyrklaff M, Neupert W, Reichert AS (2009) Formation of cristae and crista junctions in mitochondria depends on antagonism between Fcj1 and Su e/g. J Cell Biol 185: 1047-1063.

Re DB, Le Verche V, Yu C, Amoroso MW, Politi KA, Phani S, Ikiz B, Hoffmann L, Koolen M, Nagata T, Papadimitriou D, Nagy P, Mitsumoto H, Kariya S, Wichterle H, Henderson CE, Przedborski S (2014) Necroptosis drives motor neuron death in models of both sporadic and familial ALS. Neuron 81: 1001-1008.

Ronchi D, Riboldi G, Del Bo R, Ticozzi N, Scarlato M, Galimberti D, Corti S, Silani V, Bresolin N, Comi GP (2015) *CHCHD10* mutations in Italian patients with sporadic amyotrophic lateral sclerosis. Brain Jan 8: pii: awu384.

Rustin P, Chrétien D, Bourgeron T, Gérard B, Rötig A, Saudubray JM, Munnich A (1994) Biochemical and molecular investigations in respiratory chain deficiency. Clin Chim Acta 228: 35-51.

Santos J, Meyer J, Mandavilli B, Van Houten, B. (2006) Quantitative PCR-based measurement of nuclear and mitochondrial DNA damage and repair in mammalian cells. Methods Mol Biol 314: 183-199.

Sarzi E, Bourdon A, Chretien D, Zarhrate M, Corcos J, Slama A, Cormier-Daire V, de Lonlay P, Munnich A, Rötig, A. (2007) Mitochondrial DNA depletion is a prevalent cause of multiple respiratory chain deficiency in childhood. J Pediatr 150: 531-534.

Shull S, Heintz NH, Periasamy M, Manohar M, Janssen YM, Marsh JP, Mossman BT (1991) Differential regulation of antioxidant enzymes in response to oxidants. J Biol Chem 266: 24398-24403.

Tait SW, Parsons MJ, Llambi F, Bouchier-Hayes L, Connell S, Muñoz-Pinedo C, Green DR (2010) Resistance to caspase-independent cell death requires persistence of intact mitochondria. Dev Cell 18: 802-813.

Tashiro Y, Urushitani M, Inoue H, Koike M, Uchiyama Y, Komatsu M, Tanaka K, Yamazaki M, Abe M, Misawa H, Sakimura K, Ito H, Takahashi R (2012) Motor neuron-specific disruption of proteasomes, but not autophagy, replicates amyotrophic lateral sclerosis. J Biol Chem 287: 42984-42994.

Tokuyasu KT (1973) A technique for ultracryotomy of cell suspensions and tissues. J Cell Biol 57: 551-565.

von der Malsburg K, Müller JM, Bohnert M, Oeljeklaus S, Kwiatkowska P, Becker T, Loniewska-Lwowska A, Wiese S, Rao S, Milenkovic D, Hutu DP, Zerbes RM, Schulze-Specking A, Meyer HE, Martinou JC, Rospert S, Rehling P, Meisinger C, Veenhuis M, Warscheid B, van der Klei IJ, Pfanner N, Chacinska A, van der Laan M (2011) Dual role of mitofilin in mitochondrial membrane organization and protein biogenesis. Dev Cell 21: 694-707.

Wakabayashi J, Zhang Z, Wakabayashi N, Tamura Y, Fukaya M, Kensler TW, Iijima M, Sesaki H (2009) The dynamin-related GTPase Drp1 is required for embryonic and brain development in mice. J Cell Biol 186: 805-816.

Wang Y, Bogenhagen DF (2006) Human mitochondrial DNA nucleoids are linked to protein folding machinery and metabolic enzymes at the mitochondrial inner membrane. J Biol Chem 281: 25791-25802.

Yakes FM, Van Houten B (1997) Mitochondrial DNA damage is more extensive and persists longer than nuclear DNA damage in human cells following oxidative stress. Proc Natl Acad Sci.USA 94: 514-519.

Yeo W, Gautier J (2004) Early neural cell death: dying to become neurons. Dev Biol 274: 233-244.

Zanna C, Ghelli A, Porcelli AM, Karbowski M, Youle RJ, Schimpf S, Wissinger B, Pinti M, Cossarizza A, Vidoni S, Valentino ML, Rugolo M, Carelli V (2008) *OPA1* mutations associated with dominant optic atrophy impair oxidative phosphorylation and mitochondrial fusion. Brain 131: 352-367.

Zerbes RM, van der Klei IJ, Veenhuis M, Pfanner N, van der Laan M, Bohnert M (2012) Mitofilin complexes: conserved organizers of mitochondrial membrane architecture. Biol Chem 393: 1247-1261.

Zhang M, Xi Z, Zinman L, Bruni AC, Maletta RG, Curcio SA, Rainero I, Rubino E, Pinessi L, Nacmias B, Sorbi S, Galimberti D, Lang AE, Fox S, Surace EI, Ghani M, Guo J, Sato C, Moreno D, Liang Y, Keith J, Traynor BJ, St George-Hyslop P, Rogaeva E (2015) Mutation analysis of *CHCHD10* in different neurodegenerative diseases. Brain Mar 31. pii: awv082.

LEGENDS TO FIGURES

Figure 1. CHCHD10 is a constituent of MICOS complex that is disassembled in patient fibroblasts. A. Second dimension of the Blue-Native (BN) PAGE showing that CHCHD10 migrates with the MICOS protein subunits Mitofilin, CHCHD3 and CHCHD6 in isolated

mitochondria from mouse brain. **B.** BN-PAGE of the MICOS and OXPHOS complexes in control (C) and patient (P1, P2) fibroblasts. Complexes I to IV of OXPHOS were detected with the 39kDa subunit antibody (CI), 70kDa subunit antibody (CII), core I antibody (CIII) and cytochrome *c* oxidase subunit I antibody (CIV). MICOS complex was detected with an anti-Mitofilin antibody. **C.** Second dimension of the BN-PAGE showing that the steady-state levels of assembled CHCHD10 in MICOS complex are decreased in patient fibroblasts. **D.** Analysis of OXPHOS supercomplexes in control and patient fibroblasts. BN-PAGE from isolated mitochondria permeabilized with 6g/g (w/v) of digitonin immunoblotted on PVDF membrane and incubated with the indicated antibodies. SC, supercomplexes $I+III_2+IV_n$. **E.** Co-immunonoprecipitation (IP) of endogenous mitofilin and CHCHD10 in control and patient fibroblasts. PCNA antibodies were used as negative control. The same results were found in P2 fibroblasts (not shown). **F.** Duolink proximity ligation assay between Mitofilin and CHCHD10 (upper panels) and, CHCHD10 and CHCHD6 (lower panels) in control and patient fibroblasts observed by confocal microscopy. Mitochondria were stained with Mitotracker. Duolink spots per cell were quantified for 30 randomly-selected individual cells per each studied fibroblast cell line from 2 independent experiments. Differences between the cell lines were analyzed by Student's t-test: extremely significant (***: $p<0.001$).

Figure 2. Decrease of nucleoid number without mtDNA depletion in patient fibroblasts. A. In control and patient fibroblasts, nucleoids were labeled with an antibody against DNA and mitochondria were stained with Mitotracker. Image analysis was performed by confocal microscopy. **B-C.** The average number (B) and size (C) of nucleoids, labeled with antibodies against DNA shown in A, were quantified for 35 randomly-selected individual cells per each studied fibroblast cell line from 2 independent experiments. Differences between the cell lines were analyzed by Student's t-test: extremely significant (***: $p<0.001$). **D.** Mitochondrial DNA content in control and patient fibroblasts was quantified by real-time PCR. Data were

expressed as *ratio* between mtDNA and nuclear DNA concentration. Results represent the mean of relative PCR ± SD of 3 independent experiments.

Figure 3. Decrease of nucleoid number without mtDNA depletion in HeLa cells overexpressing the *CHCHD10*^{S59L} and *CHCHD10*^{P34S} alleles. A. Transfections were performed with empty vector (EV) or vectors encoding wild-type CHCHD10-Flag (WT), CHCHD10-Flag (S59L) or CHCHD10-Flag (P34S) mutants. Mitochondria were stained with Mitotracker. Cells overexpressing wild-type and mutant CHCHD10 were labeled with Flag antibodies. Nucleoids were visualized with an antiserum against DNA. Image analysis was performed by confocal microscopy. **B-C.** The average number (B) and size (C) of nucleoids, labeled with antibodies against DNA shown in A, were quantified for 35 randomly-selected individual cells per each studied cell line from 2 independent experiments. Differences between the cell lines were analyzed by Student's t-test: very significant (**: $0.01>p>0.001$) or extremely significant (***: $p<0.001$). **D.** Mitochondrial DNA content was quantified by real-time PCR. Data were expressed as *ratio* between mtDNA and nDNA concentration. Results represent the mean of relative PCR ± SD of 3 independent experiments.

Figure 4. Nucleoid disorganization in patient fibroblasts leading to a defect in mtDNA repair under conditions of oxidative stress. A. Mitochondria from patient and control fibroblasts were incubated with NP-40 and separated into pellets and supernatants. Ratio of mtDNA amplified from supernatant/mtDNA amplified from pellet, by qPCR, was quantified in control and patient fibroblasts. **B.** Determination of the mtDNA copy number after H_2O_2 treatment. mtDNA/nDNA values in control, patient 1 and patient 2 fibroblasts. mtDNA : mitochondrial DNA, nDNA: nuclear DNA. **C.** mtDNA repair after H_2O_2 treatment. A long-range PCR was used to evaluate the oxidative damage, induced by H_2O_2 treatment, in mtDNA. The relative PCR amplification of a 15.6kb mtDNA fragment was normalized to mtDNA copy number that was evaluated by PCR amplification of a 172bp mtDNA fragment.

mtDNA repair activity in control, patient 1 and patient 2 fibroblasts. **B-C.** Cells were induced with tetracylin overnight, exposed to 150µM H_2O_2 for 30 min and either harvested immediately or allowed to recover in conditioned medium for the indicated times. Untreated control cultures were incubated in serum-free medium alone. Results represent the mean of relative PCR amplification ± SD of three independent experiments in which three PCRs per point were performed. Values were normalized to untreated cells and differences were analyzed by Student's t-test: significant (*:0.05>*p*>0.01), very significant (**:0.01>*p*>0.001). NT: cells not treated with H_2O_2.

Figure 5. No autophagy inhibition (A-C) and no mitophagy defect (D-E) in patient fibroblasts. A. Immunoblot of LC3B-I/-II expression in fibroblasts of patient 2 (1,2), patient 1 (3,4) and control individual (5,6) in absence (-) or presence (+) of chloroquine (CLQ). **B.** Quantitative analysis of LC3B-II/β-tubulin ratio from immunoblots (n=3). **C.** Quantitative analysis of LC3B-II + CLQ/ LC3B-II - CLQ ratio from immunoblots (n=3). **D.** Confocal images of fibroblasts derived from a control, patient 1 and patient 2. Boxed regions are enlarged. Scale bar: 20µm. **E.** Bar graph showing ratios of fluorescent intensity of mitochondria delivered to lysosomes relative to that of mitochondria present in the cytosol (FL_{lyso}/FL_{mito}).

Figure 6. C*HCHD10* mutant fibroblasts are less sensitive to apoptotic cell death compared to control fibroblasts. A. Control (C1, C2) and patient (P1, P2) fibroblasts were treated with 1 µM of staurosporine (STS) for 16 h. Cell death was determined by flow cytometry using Annexin V/DAPI staining. **B-C.** Fibroblasts were treated with 1 µM STS for 4, 6 or 16 h (O/N), and caspase activation was determined either by western blot (B) assessing the cleavage of PARP and the caspase 3 (actin was used as a loading control) or by DEVDase activity measurement (C). **D-E.** Mitochondrial membrane potential (ΔΨM) was measured by flow cytometry in control and patient fibroblasts after treatment of 1µM STS for 24 h (E) and

quantified in D. Differences between the control and patient fibroblasts were analyzed by Student's t-test: significant (*:0.05>p>0.01) or extremely significant (***:p<0.001).

Figure 7. Overexpression of the *CHCHD10* mutant alleles in HeLa cells leads to inhibition of apoptotic cell death. Transfections were performed with empty vector (EV) or vectors encoding either wild-type CHCHD10-Flag (WT) or mutant CHCHD10-Flag (P34S and S59L). **A.** Western blot on HeLa cells extracts using antibodies against Flag or Hsp90. **B-D.** HeLa cells transiently expressing the WT or mutated forms of CHCHD10-Flag (P34S or S59L) were treated with 1 µM Actinomycine D (ActD) for 4, 6 or 8 h with measurement of Annexin V/DAPI staining (B), DEVD-ase activity (C). **D.** Mitochondrial outer membrane permeabilization was determined by western blot by assessing the degradation of Smac. Hsp90 was used as a loading control**.** Differences between the mutated and non mutated fibroblasts were analyzed by Student's t-test: significant (*:0.05>p>0.01) or very significant (**:0.01>p>0.001).

Figure 8. Model for the differential actions of wild-type (WT) and mutant CHCHD10 proteins in mitochondria. A. Model of WT CHCHD10 function. CHCHD10 (D10) resides with mitofilin (IMMT), CHCHD3 (D3) and CHCHD6 (D6) in the mitochondrial inner membrane organizing system (MICOS) complex. **B.** Model of deleterious effects of mutant CHCHD10. *CHCHD10* mutations lead to MICOS complex disassembly and loss of mitochondrial cristae with impairment of complex IV (CIV) assembly and CIII + CIV super-complex formation leading to a respiratory chain (RC) deficiency. Nucleoids are disorganized in *CHCHD10* mutant cells resulting in defect in mtDNA repair after oxidative stress. *CHCHD10* mutations have no impact on mitophagy. However, the expression of *CHCHD10* mutant alleles prevents cytochrome *c* release and thus inhibits apoptosis *via* the caspase-dependent pathway. OMM, outer mitochondrial membrane; IMS, intermembrane mitochondrial space; IMM, inner mitochondrial membrane.

Supplementary figure 1. Ultrastructural alterations and mitochondrial fragmentation in fibroblasts of patient 2. A. Ultrastructural analysis of control (upper panel) and patient 2 (middle and lower panels) fibroblasts. **B.** Cells obtained from a control and patient 2 were analyzed by confocal microscopy using Mitotracker Red. **C.** Mitochondrial phenotypes showed in B were quantified for 35 randomly-selected individual cells per each studied fibroblast cell line from 2 independent experiments. The data obtained were used to calculate the total length of the mitochondrial network per cell. Differences between the 2 cell lines were analyzed by Student's t-test: extremely significant (***: $p<0.001$).

Supplementary figure 2. Fusion analysis in patient fibroblasts. Control and patient fibroblasts expressing mitochondria-targeted photoactivatable GFP (mitoPAGFP) were stained with 7 nM tetramethylrhodamine ethyl ester (TMRE). mitoPAGFP was photoactivated with 405-nm laser in a small region of cells (30 x 30 pixels) at 0 min. Fibroblasts were observed with 15-min intervals for 60 min. Fluorescence intensity of mitoPAGFP was quantified using NIH Image J. Values represent the mean ± S.E.M (n = 7 for control and 9 for patients). The results of control and patient 1, that were shown to allow comparison with those of patient 2, were previously published (Bannwarth et al., 2014).

Supplementary figure 3. Decrease of nucleoid number in patient fibroblasts shown by using anti-TFAM antibodies. A. In control and patient fibroblasts, nucleoids were labeled with antibodies against TFAM and mitochondria were stained with Mitotracker. Image analysis was performed by confocal microscopy. **B-C.** The average number (B) and size (C) of nucleoids, labeled with antibodies against TFAM shown in A, were quantified for 35 randomly-selected individual cells per each studied fibroblast cell line from 2 independent experiments. Differences between the cell lines were analyzed by Student's t-test: extremely significant (***: $p<0.001$).

Supplementary figure 4. Overexpression of the *CHCHD10^{P34S}* allele in HeLa cells leads to fragmentation of the mitochondrial network. Transfections were performed with empty vector (EV) or vectors encoding either wild-type CHCHD10-Flag (WT) or mutant CHCHD10-Flag (P34S). **A.** Western blot on HeLa cells extracts using antibodies against Flag or GAPDH. **B.** Analysis of Mitotracker (red) staining and CHCHD10-Flag (green) immuno-labeling by fluorescence microscopy in HeLa cells transfected with empty vector (EV), wild-type CHCHD10-Flag (WT) or mutant CHCHD10-Flag (P34S). **C.** Quantification of mitochondrial phenotypes of cells transfected with empty vector (EV) or vectors encoding either wild-type CHCHD10-Flag (WT) or mutant CHCHD10-Flag (P34S). Thirty five randomly-selected individual cells per each transfection were analyzed from 2 independent experiments. The data obtained were used to calculate the total length of the mitochondrial network per cell. Differences between the 2 cell lines were analyzed by Student's t-test: extremely significant (***: $p<0.001$).

Supplementary figure 5. Overexpression of the *CHCHD10^{P34S}* allele in HeLa cells leads to defect in cristae maintenance. **A.** Representative image of mitochondria in cells overexpressing the *CHCHD10^{WT}* allele. **B-C.** Representative images of mitochondria in cells overexpressing the mutant *CHCHD10^{P34S}* allele.

Supplementary figure 6. Decrease of nucleoid number in HeLa cells overexpressing the *CHCHD10^{S59L}* and *CHCHD10^{P34S}* alleles shown by using anti-TFAM antibodies. A. Transfections were performed with empty vector (EV) or vectors encoding wild-type CHCHD10-Flag (WT), CHCHD10-Flag (S59L) or CHCHD10-Flag (P34S) mutants. Mitochondria were stained with Mitotracker. Cells overexpressing wild-type and mutant CHCHD10 were labeled with anti-Flag antibody. Nucleoids were visualized with an antiserum against TFAM. Image analysis was performed by confocal microscopy. **B-C.** The average number (B) and size (C) of nucleoids, labeled with antibody against TFAM shown in

A, were quantified for 35 randomly-selected individual cells per each studied cell line from 2 independent experiments. Differences between the cell lines were analyzed by Student's t-test: very significant (**: $0.01>p>0.001$) or extremely significant (***: $p<0.001$).

Supplementary figure 7. Delayed cytochrome *c* release in C*HCHD10* mutant fibroblasts compared to control fibroblasts. Control and patient (P1, P2) fibroblasts were treated with 1μM of staurosporine (STS) for 6 h. Treated and untreated cells were immuno-labelled with anti-cytochrome *c* (upper panels) and stained with Mitotracker (medium panels). Overlays of fluorescence are shown in lower panels.

Supplementary figure 8. Delayed cytochrome *c* release in HeLa cells expressing C*HCHD10* mutant alleles. Transfections were performed with vectors encoding either wild-type CHCHD10-Flag (WT) or mutant CHCHD10-Flag (P34S and S59L) and cells were treated with 1 μM Actinomycin D (ActD) for 3 h. Treated and untreated cells were immuno-labelled with anti-cytochrome *c* and stained with Mitotracker. Overlays of fluorescence are shown. Transfected cells were revealed by immuno-labelling with anti-Flag antibody.

Supplementary table 1. Respiratory chain analysis in fibroblasts of patient 2. Spectrophotometric analysis of the respiratory chain enzyme activities in patient fibroblasts in glucose (A) and in galactose medium (B). CS, citrate synthase. Results are expressed as extreme absolute values or absolute values for controls or patients, respectively. Values are expressed in nanomols of substrate per minute per milligram of proteins (lowered values are in grey).

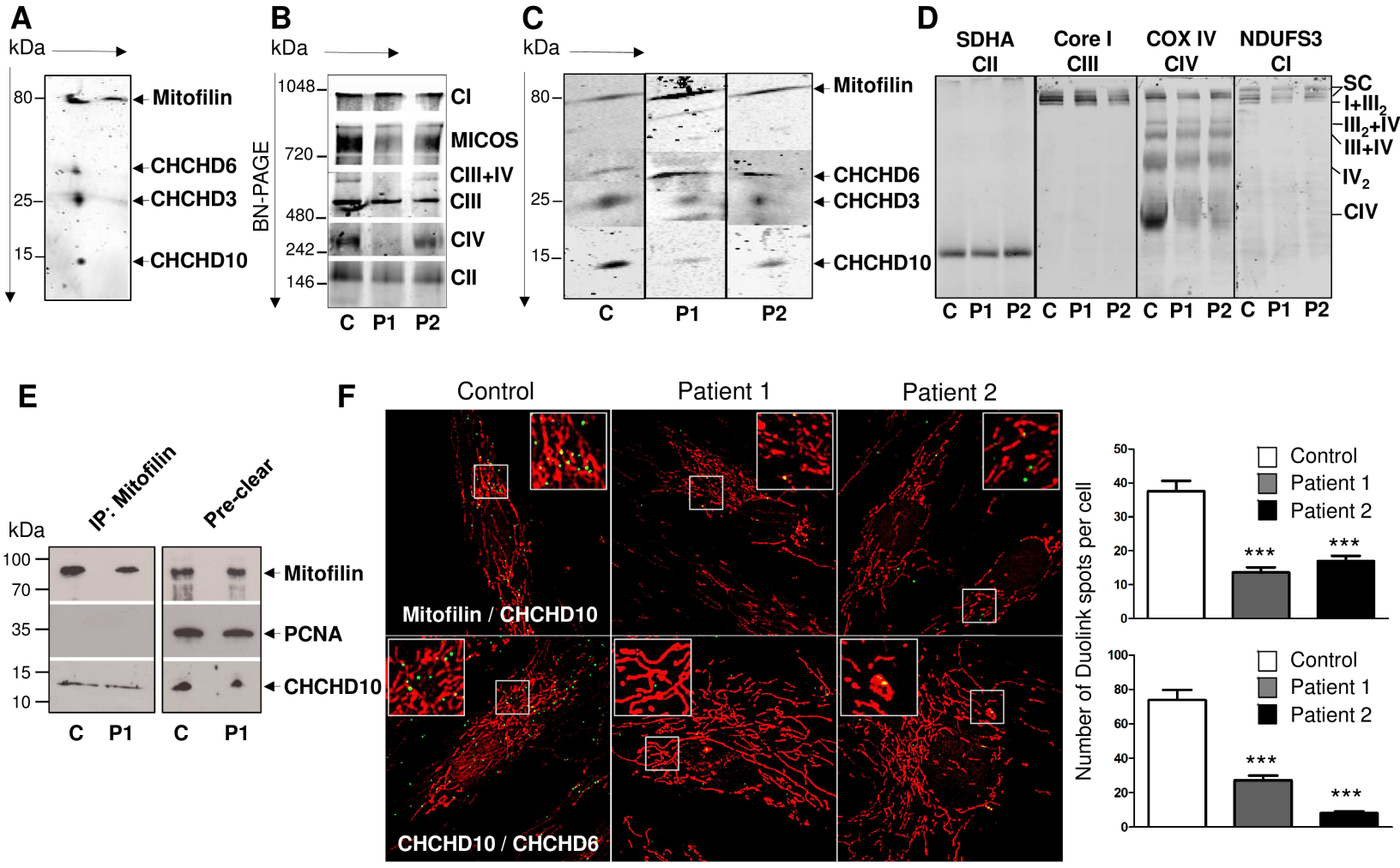

A
kDa
80
25
15
Mitofilin
CHCHD6
CHCHD3
CHCHD10
B
kDa
BN-PAGE
1048
720
480
242
146
CI
MICOS
CIII+IV
CIII
CIV
CII
C P1 P2
C
kDa
80
25
15
Mitofilin
CHCHD6
CHCHD3
CHCHD10
C P1 P2
D
SDHA CII
Core I CIII
COX IV CIV
NDUFS3 CI
SC
I+III2
III2+IV
III+IV
IV2
CIV
C P1 P2 C P1 P2 C P1 P2 C P1 P2
E
IP: Mitofilin
Pre-clear
kDa
100
70
35
15
10
Mitofilin
PCNA
CHCHD10
C P1 C P1
F
Control
Patient 1
Patient 2
Mitofilin / CHCHD10
CHCHD10 / CHCHD6
Number of Duolink spots per cell
Control
Patient 1
Patient 2
***
***
***
***

Figure 1

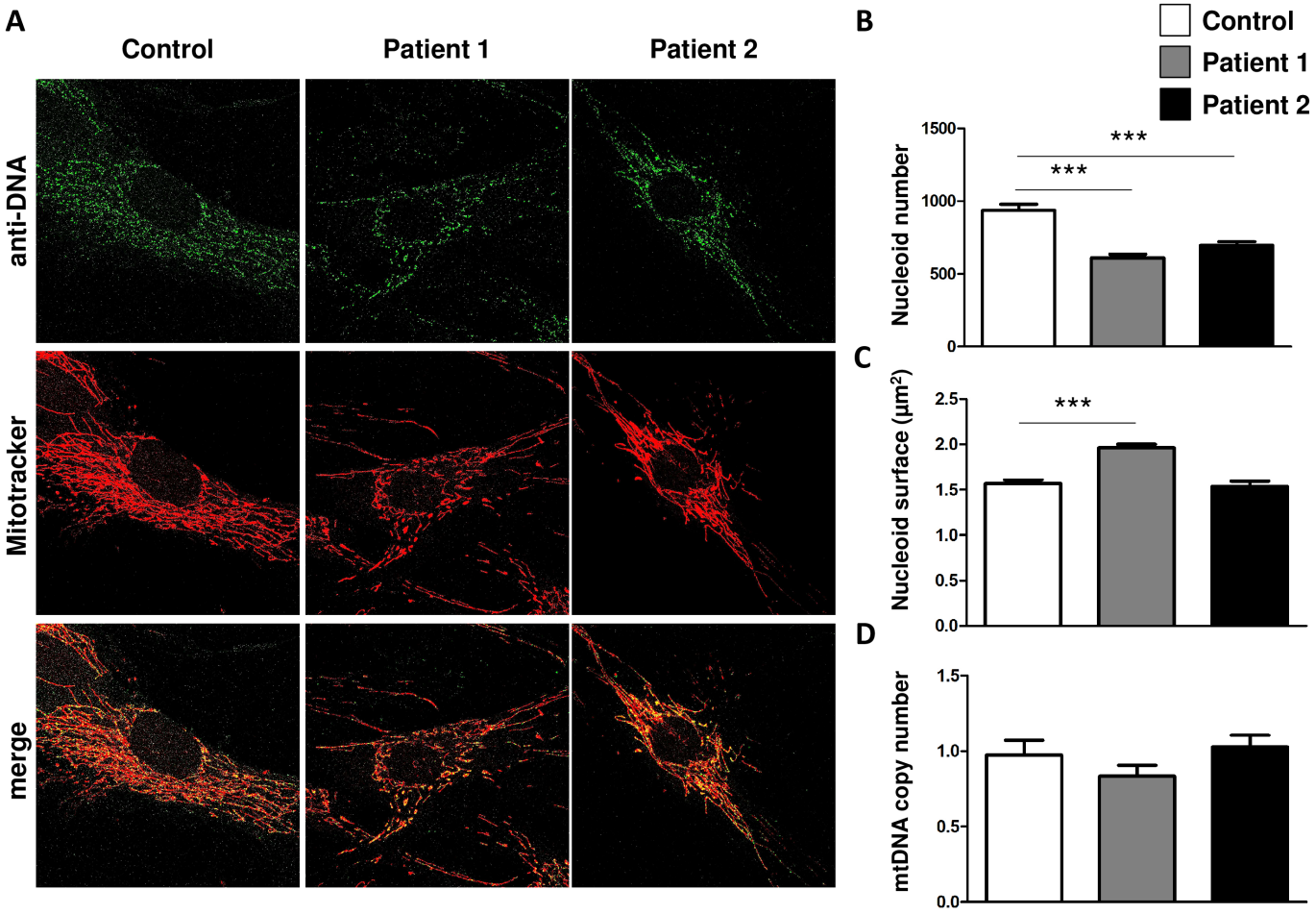

A
Control
Patient 1
Patient 2
anti-DNA
Mitotracker
merge
B
Control
Patient 1
Patient 2
Nucleoid number
1500
1000
500
0
***
***
C
Nucleoid surface (µm²)
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
***
D
mtDNA copy number
1.5
1.0
0.5
0.0

Figure 2

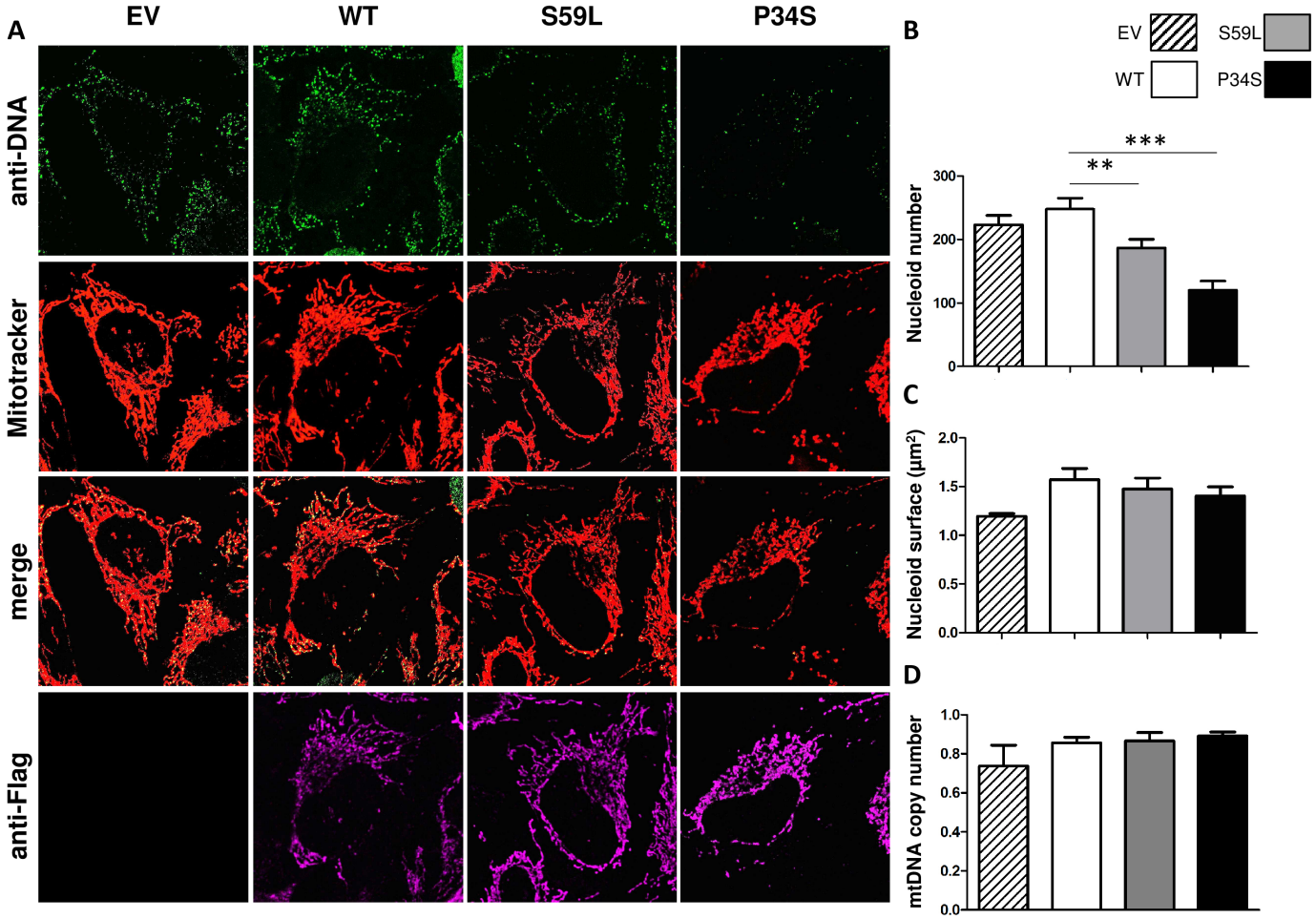

A
EV
WT
S59L
P34S
anti-DNA
Mitotracker
merge
anti-Flag
B
EV
S59L
WT
P34S
***
**
Nucleoid number
300
200
100
0
C
Nucleoid surface (µm²)
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
D
mtDNA copy number
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0

Figure 3

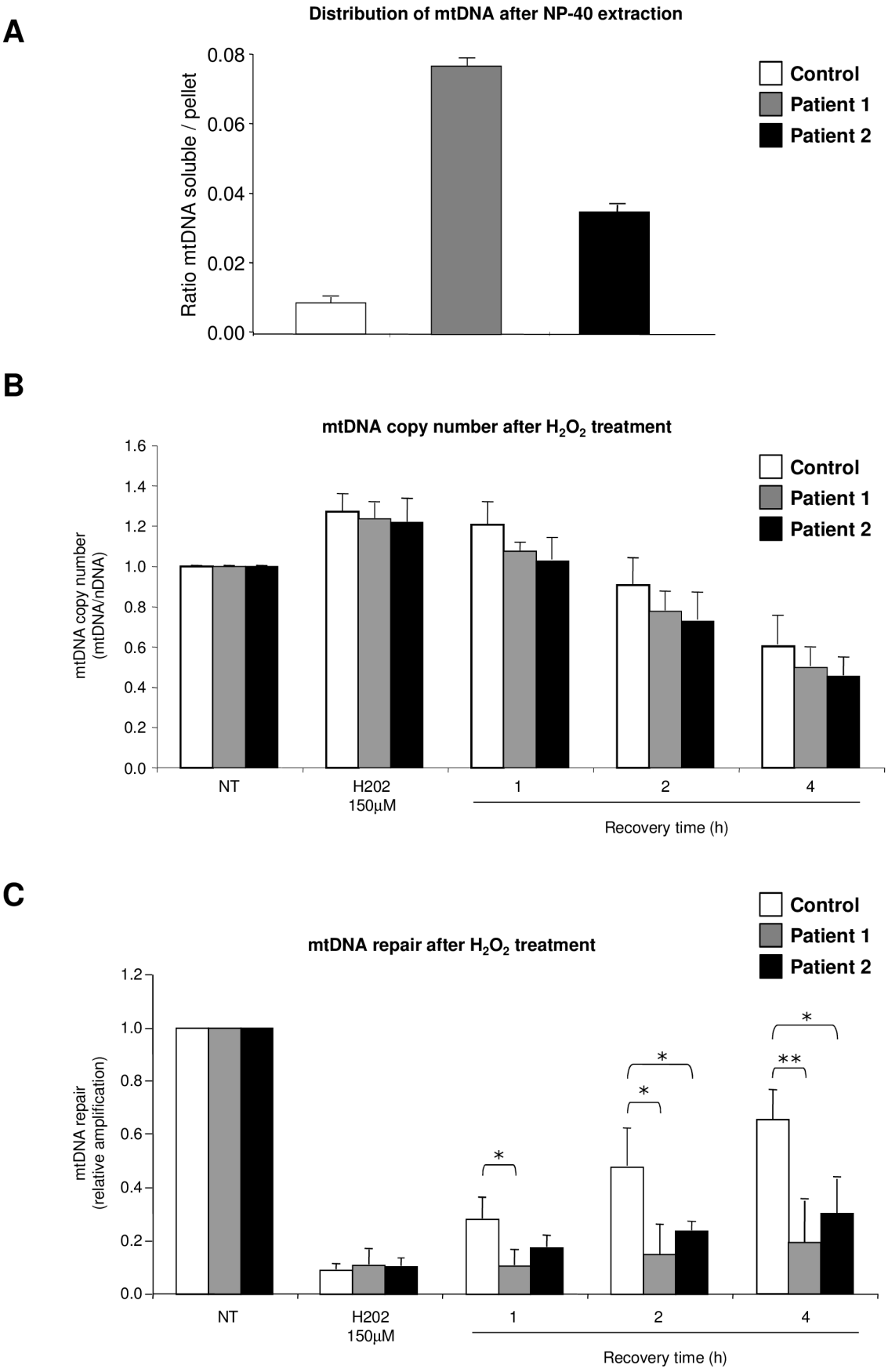

A
Distribution of mtDNA after NP-40 extraction
Ratio mtDNA soluble / pellet
0.08
0.06
0.04
0.02
0.00
Control
Patient 1
Patient 2
B
mtDNA copy number after H_2O_2 treatment
mtDNA copy number
(mtDNA/nDNA)
1.6
1.4
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
Control
Patient 1
Patient 2
NT
H202
150µM
1
2
4
Recovery time (h)
C
mtDNA repair after H_2O_2 treatment
mtDNA repair
(relative amplification)
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
Control
Patient 1
Patient 2
*
*
*
**
*
NT
H202
150µM
1
2
4
Recovery time (h)

Figure 4

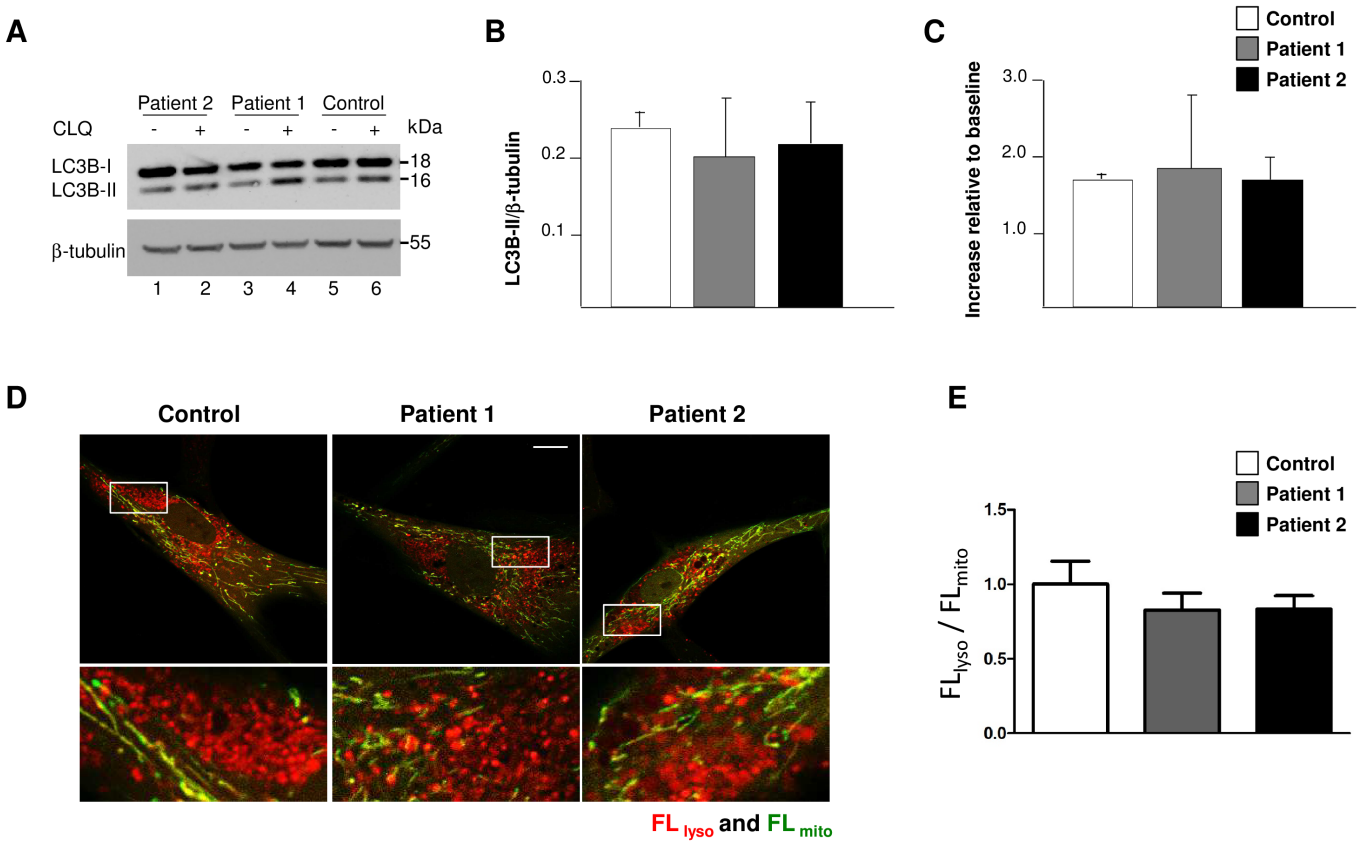

A
Patient 2
Patient 1
Control
CLQ
- + - + - +
kDa
LC3B-I
LC3B-II
18
16
β-tubulin
55
1 2 3 4 5 6
B
LC3B-II/β-tubulin
0.3
0.2
0.1
C
Control
Patient 1
Patient 2
Increase relative to baseline
3.0
2.0
1.0
D
Control
Patient 1
Patient 2
FL lyso and FL mito
E
Control
Patient 1
Patient 2
FLlyso / FLmito
1.5
1.0
0.5
0.0

Figure 5

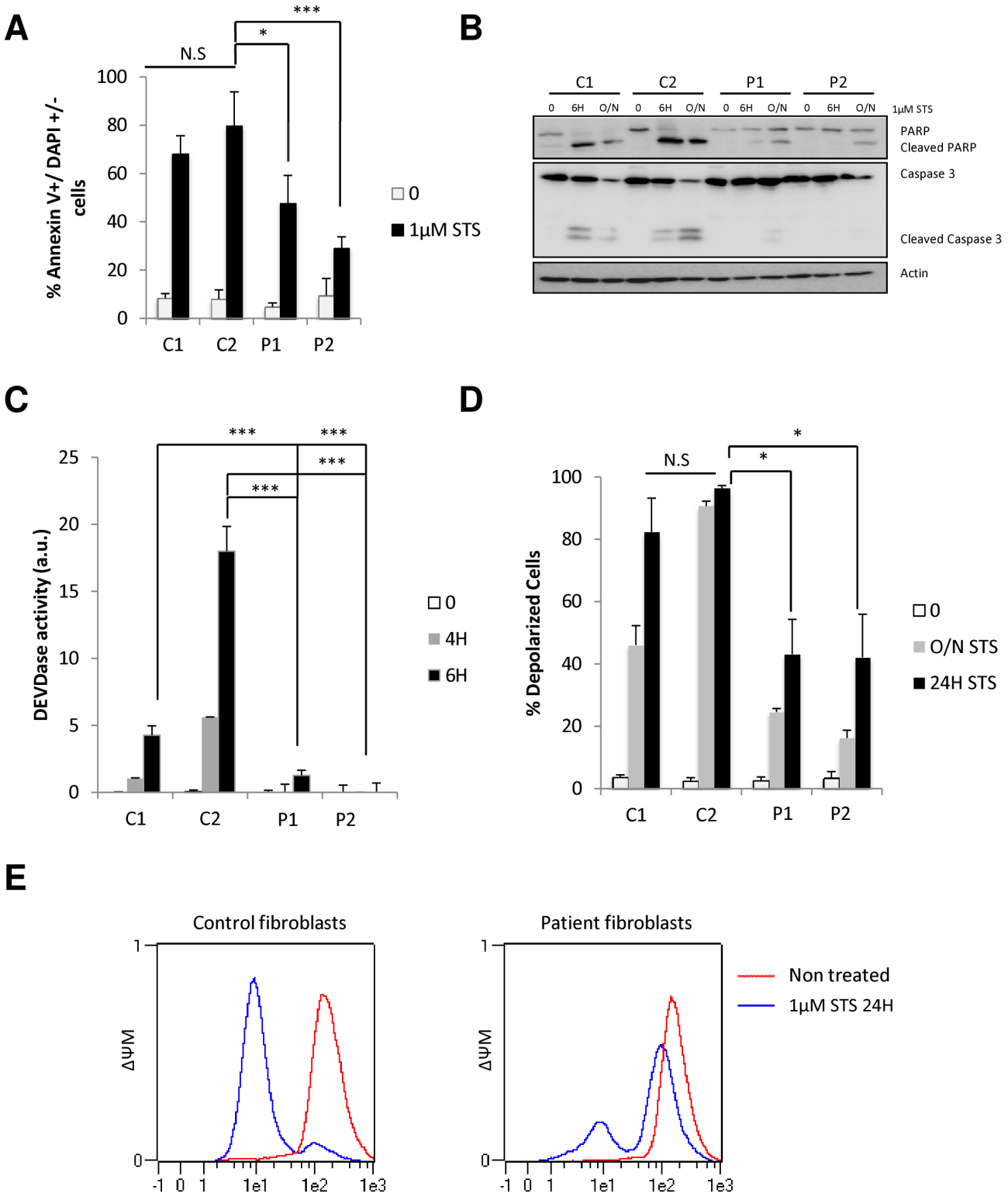

A
N.S
*
***
% Annexin V+/ DAPI +/- cells
100
80
60
40
20
0
C1
C2
P1
P2
0
1µM STS
B
C1
C2
P1
P2
0
6H
O/N
1µM STS
PARP
Cleaved PARP
Caspase 3
Cleaved Caspase 3
Actin
C
DEVDase activity (a.u.)
25
20
15
10
5
0
***
0
4H
6H
D
N.S
% Depolarized Cells
O/N STS
24H STS
E
Control fibroblasts
Patient fibroblasts
ΔΨM
Non treated
1µM STS 24H
-1
1e1
1e2
1e3

Figure 6

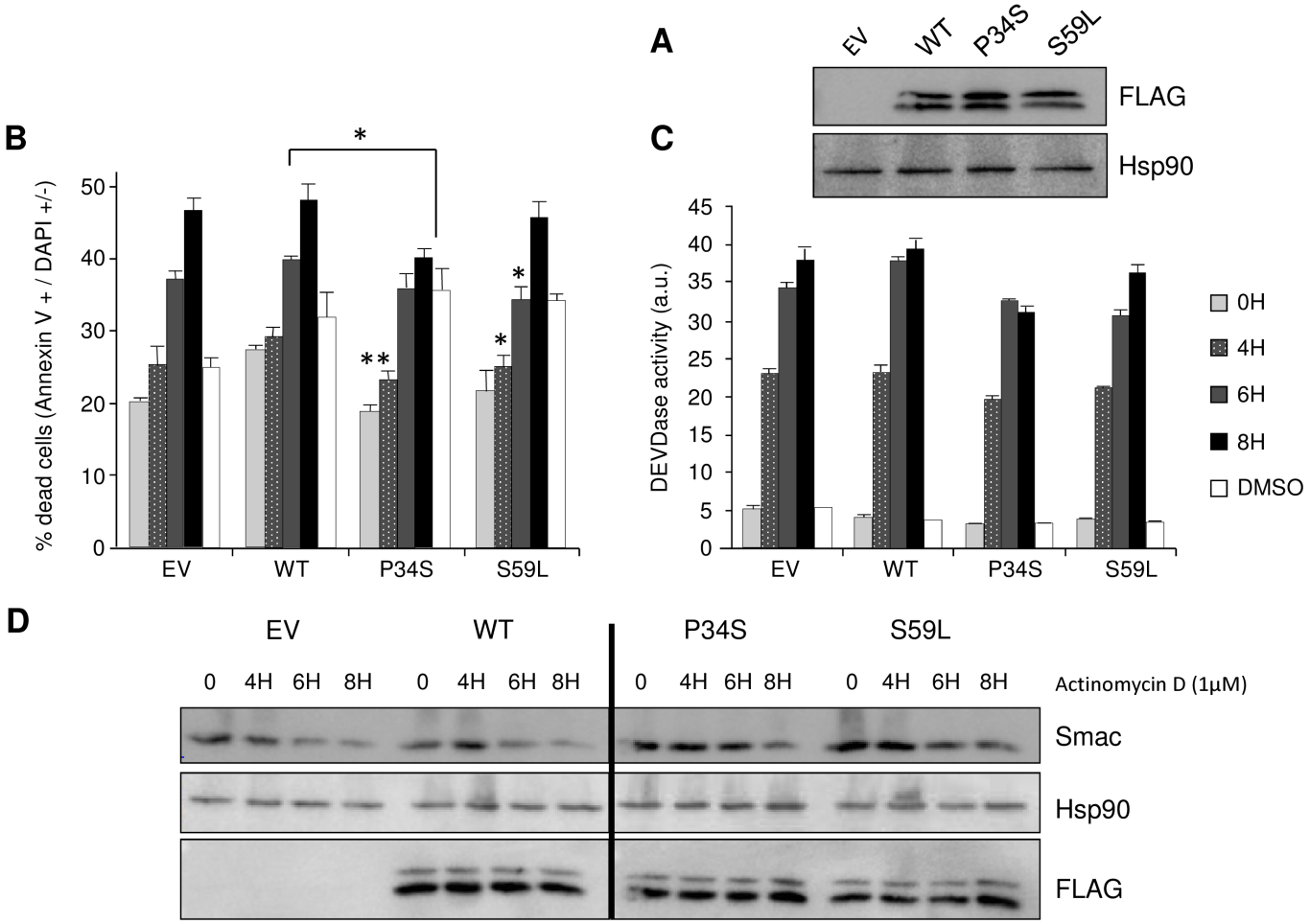

A
EV
WT
P34S
S59L
FLAG
Hsp90
B
% dead cells (Annexin V + / DAPI +/-)
50
40
30
20
10
0
*
**
*
*
EV
WT
P34S
S59L
C
DEVDase activity (a.u.)
45
40
35
30
25
20
15
10
5
0
EV
WT
P34S
S59L
0H
4H
6H
8H
DMSO
D
EV
WT
P34S
S59L
0
4H
6H
8H
0
4H
6H
8H
0
4H
6H
8H
0
4H
6H
8H
Actinomycin D (1μM)
Smac
Hsp90
FLAG

Figure 7

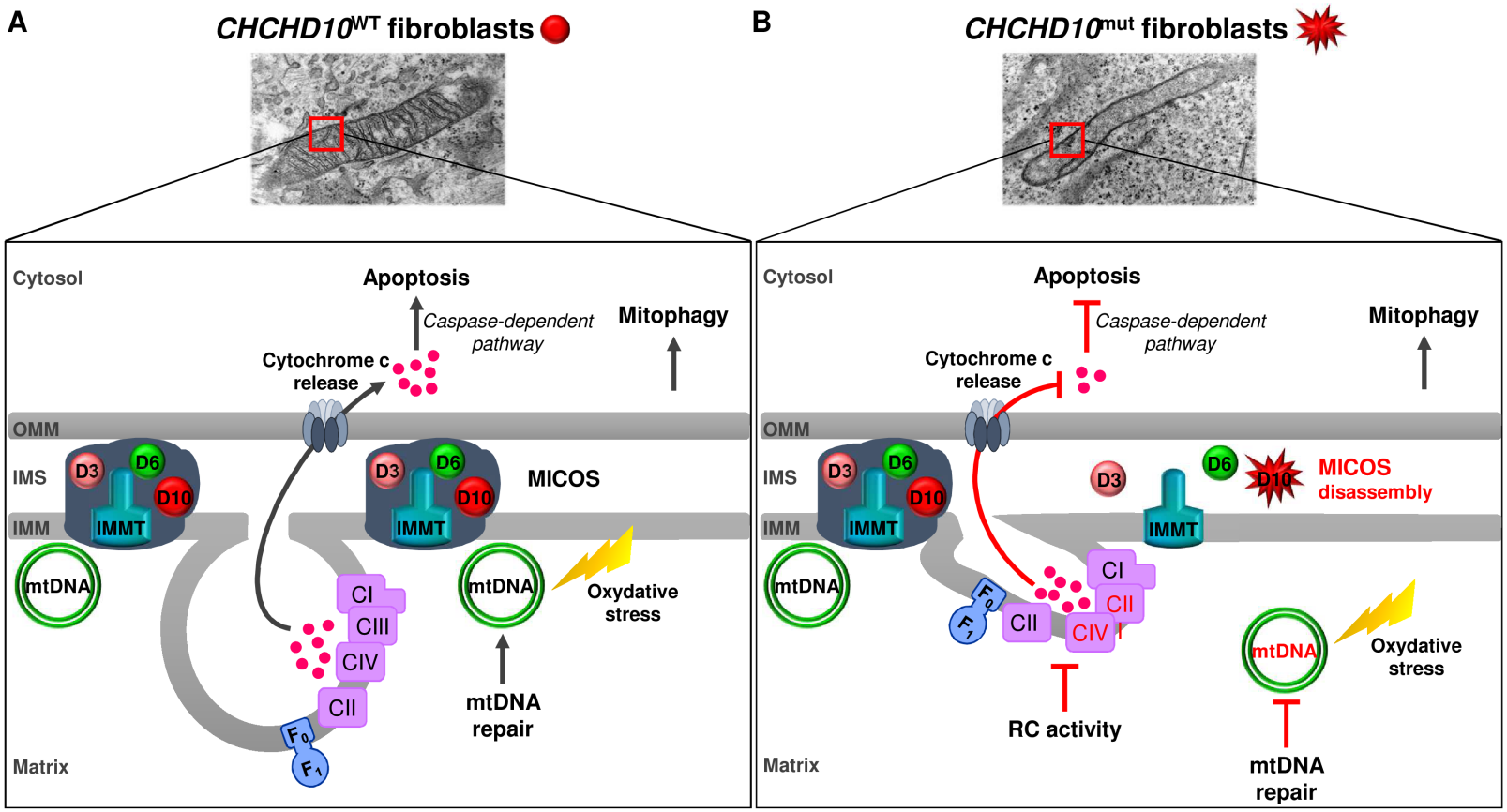
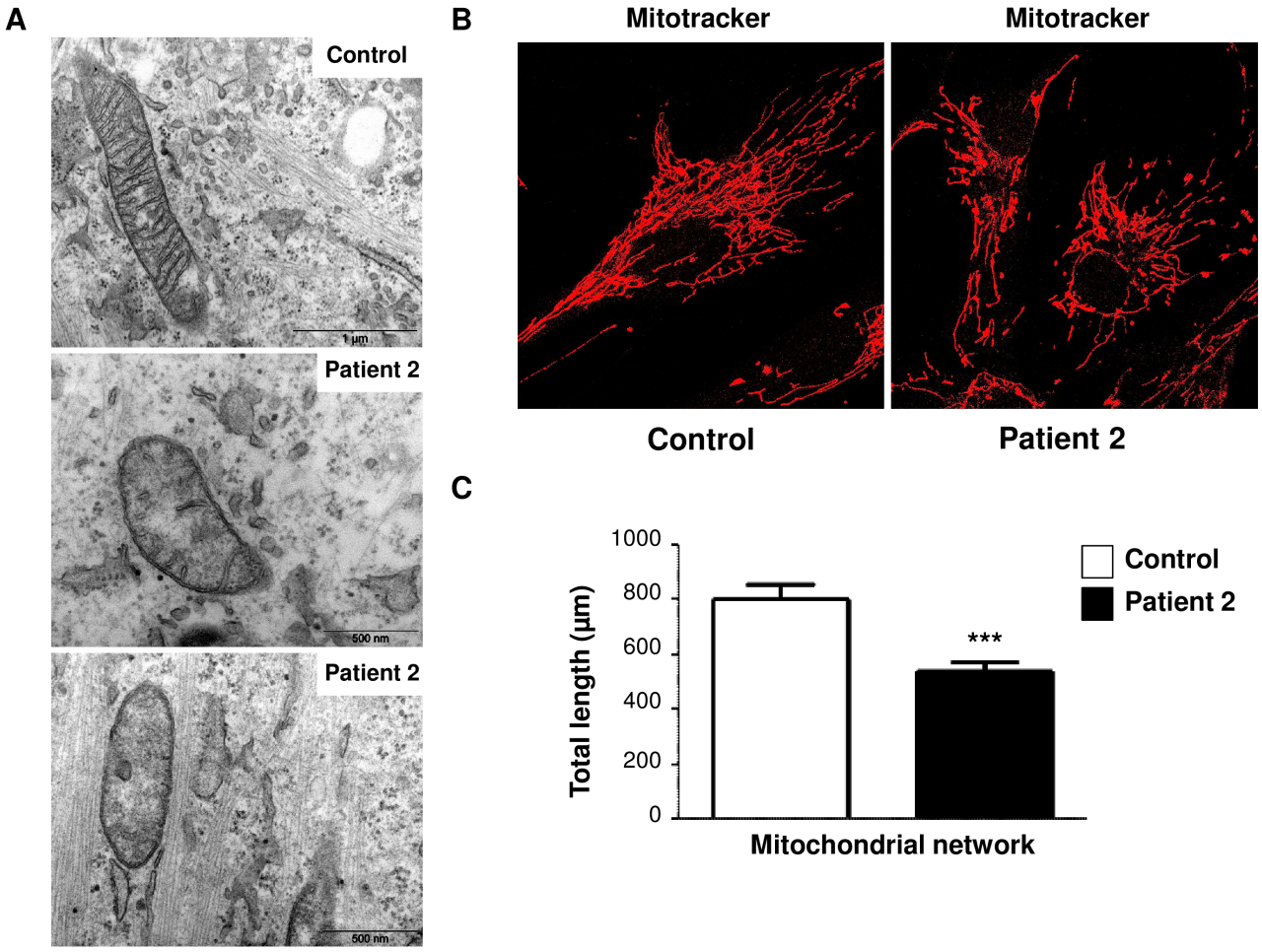
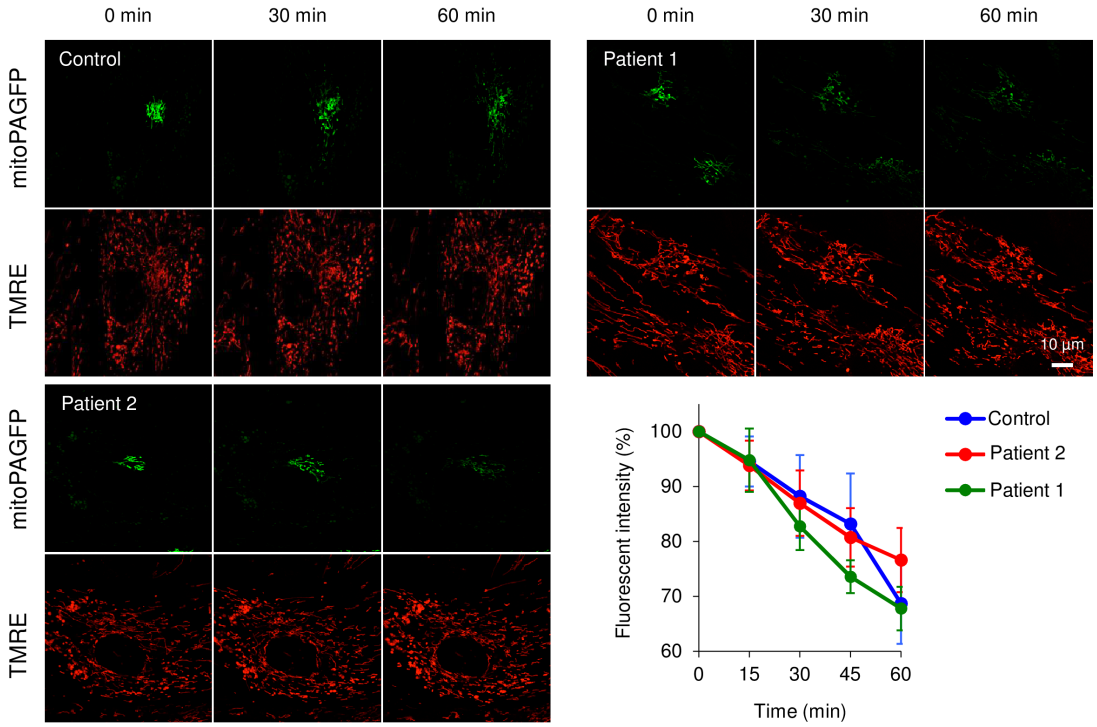

A
CHCHD10WT fibroblasts
Cytosol
Apoptosis
Caspase-dependent pathway
Mitophagy
Cytochrome c release
OMM
IMS
IMM
D3
D6
D10
IMMT
MICOS
mtDNA
CI
CIII
CIV
CII
F0
F1
Oxydative stress
mtDNA repair
Matrix
B
CHCHD10mut fibroblasts
Cytosol
Apoptosis
Caspase-dependent pathway
Mitophagy
Cytochrome c release
OMM
IMS
IMM
D3
D6
D10
IMMT
MICOS disassembly
mtDNA
CI
CII
CIV
F0
F1
Oxydative stress
RC activity
mtDNA repair
Matrix

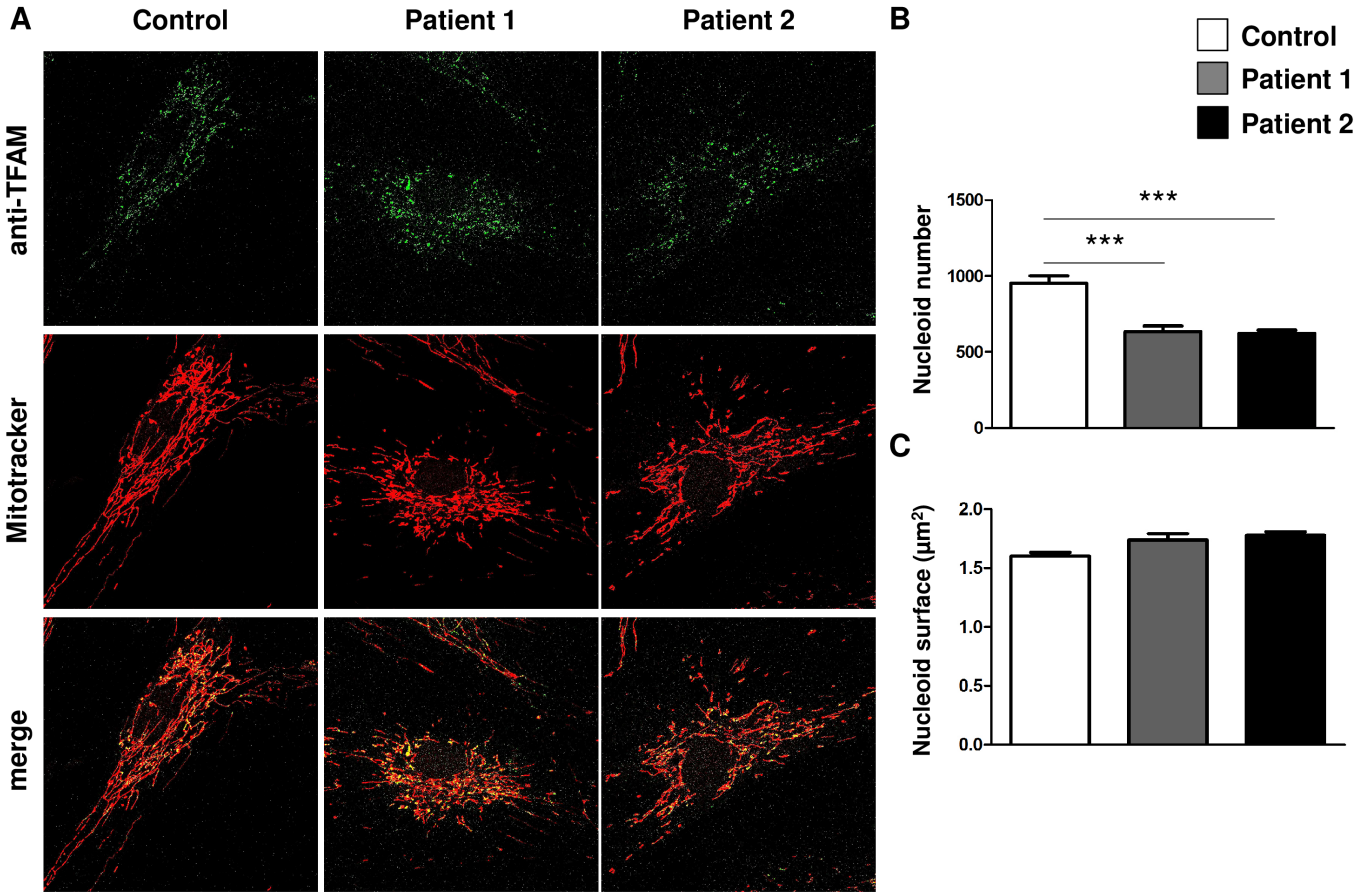
Figure 8



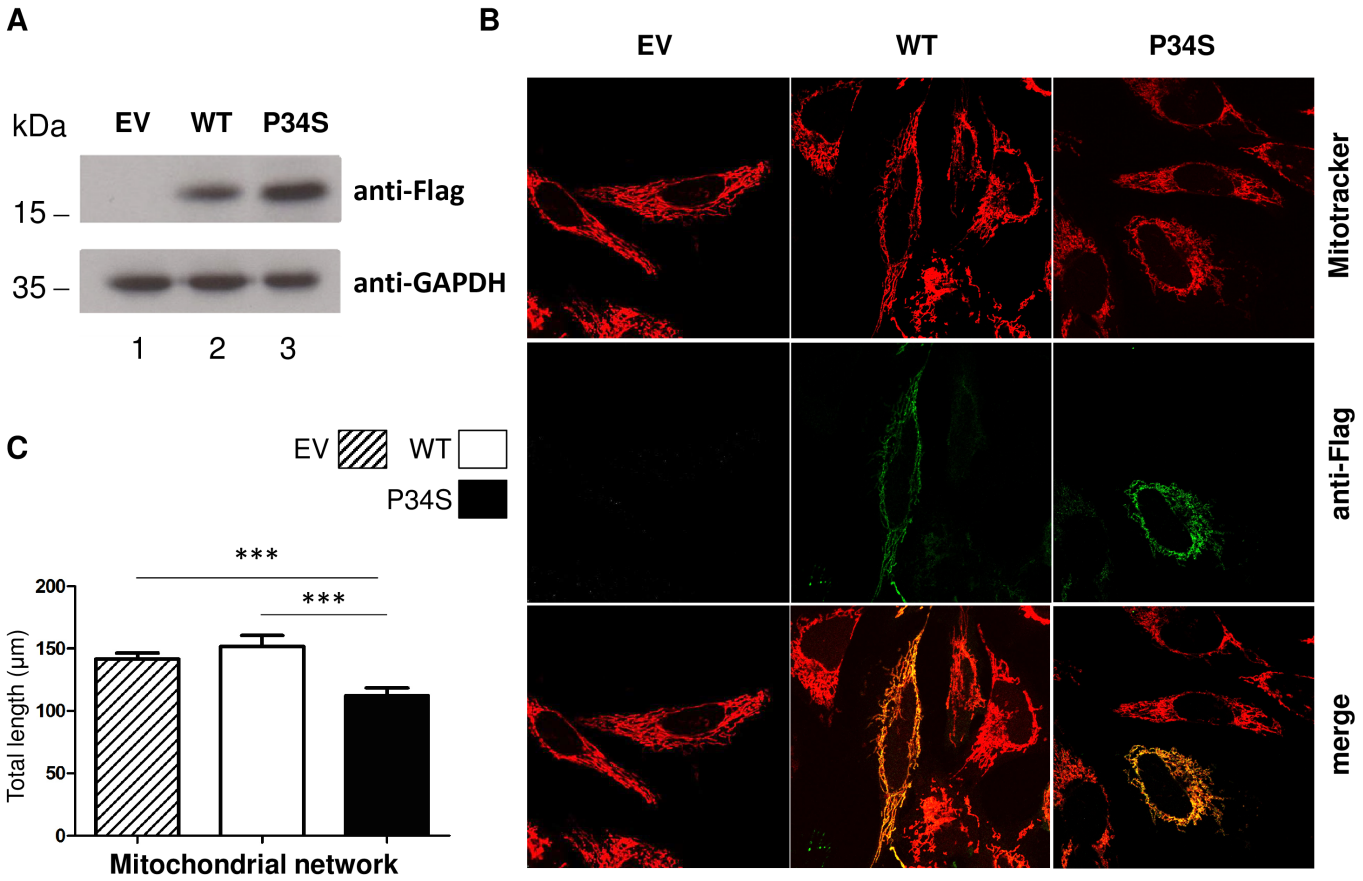
Supplementary figure 1



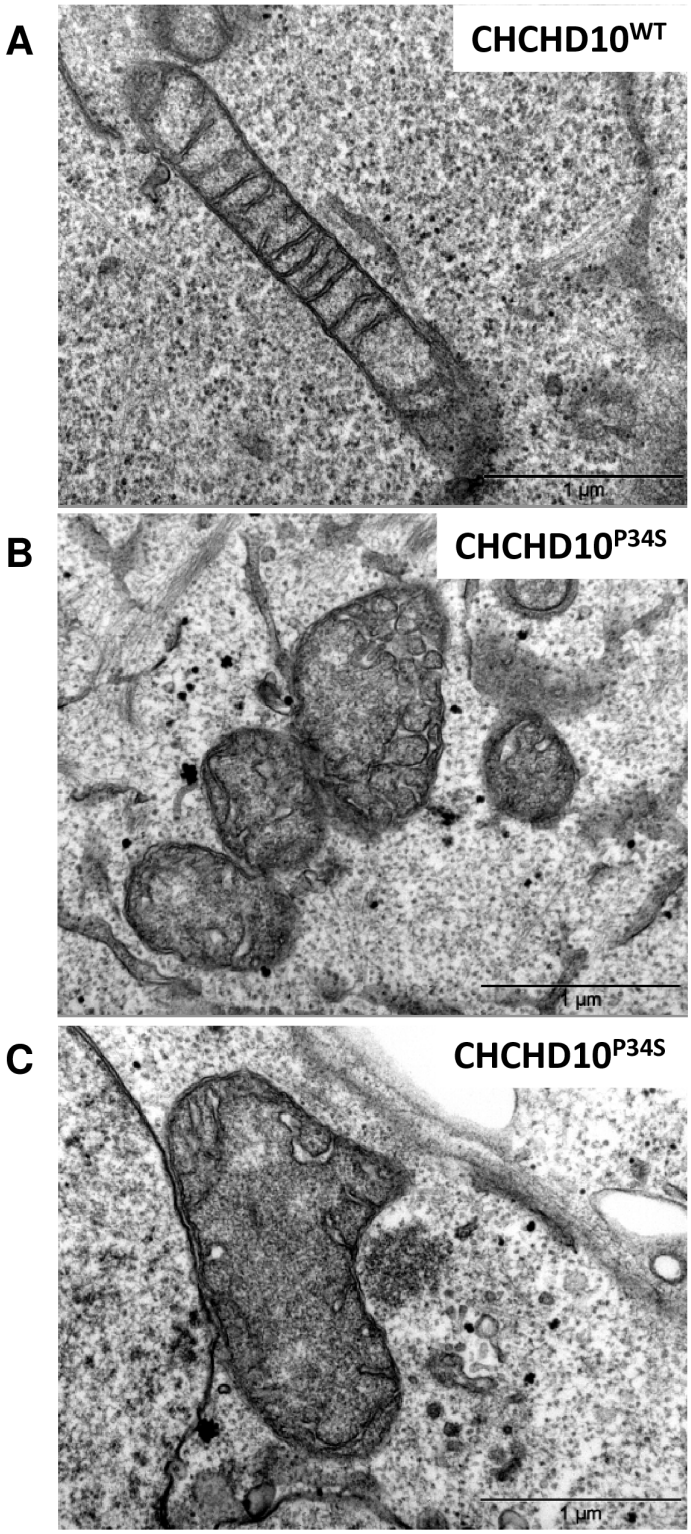
Supplementary figure 2



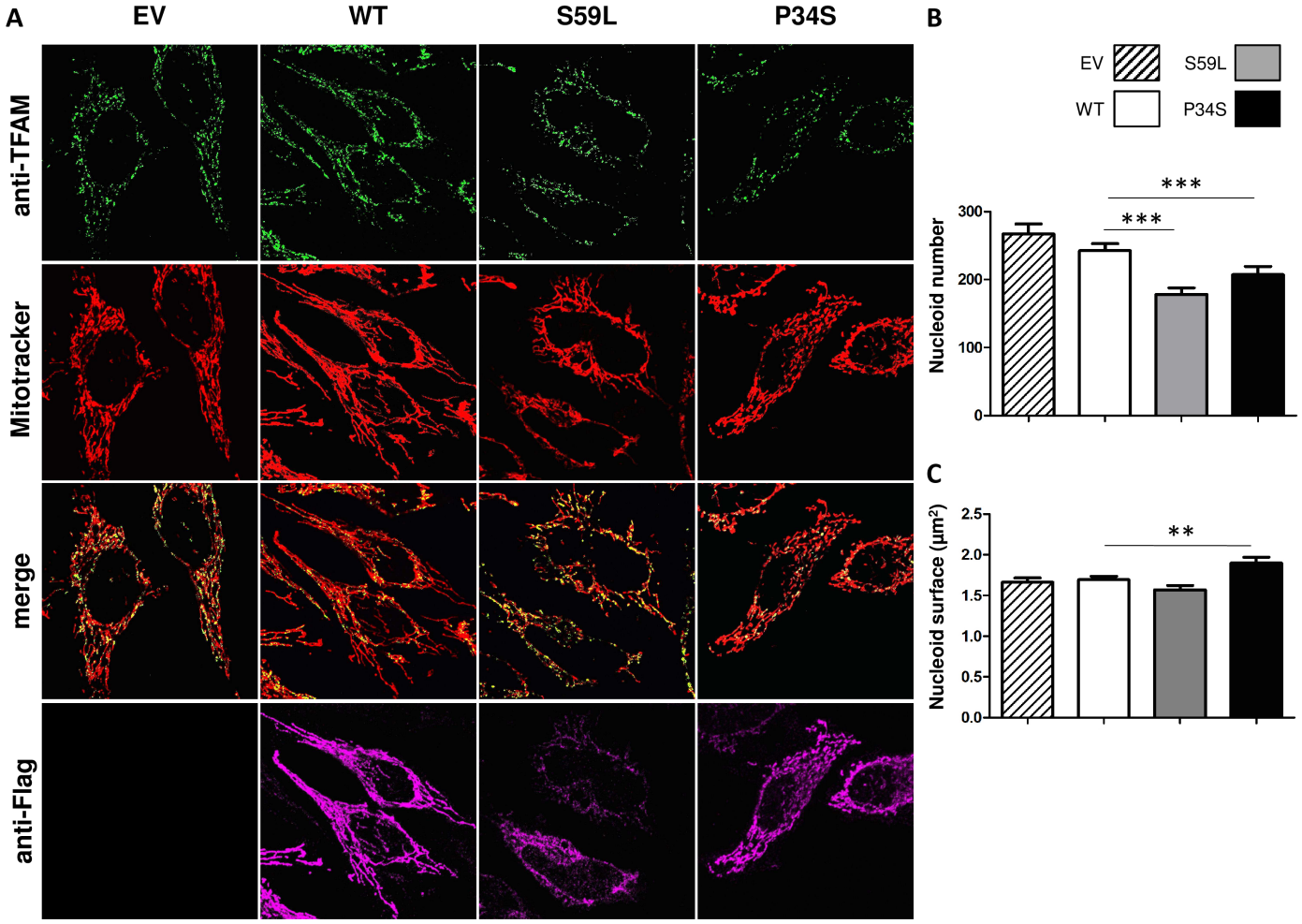
Supplementary figure 3



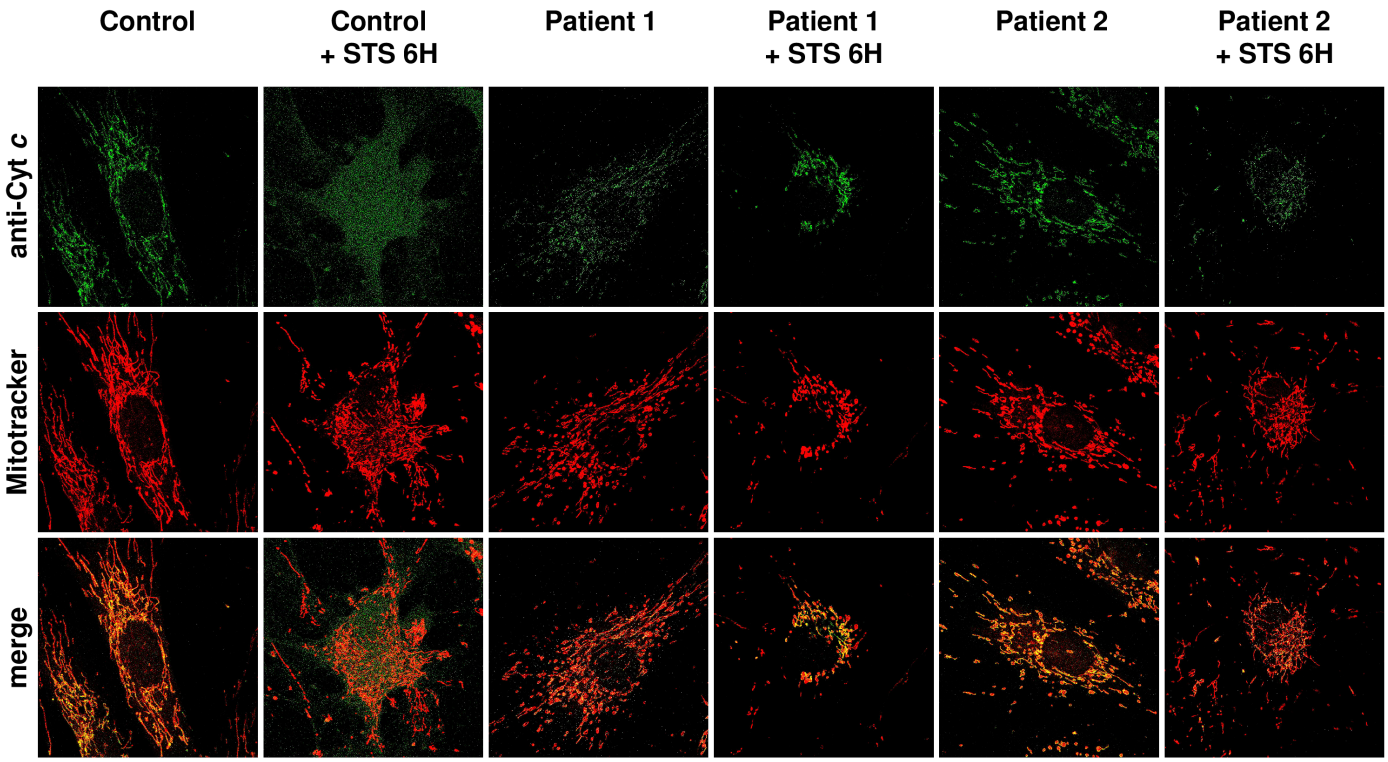
Supplementary figure 4



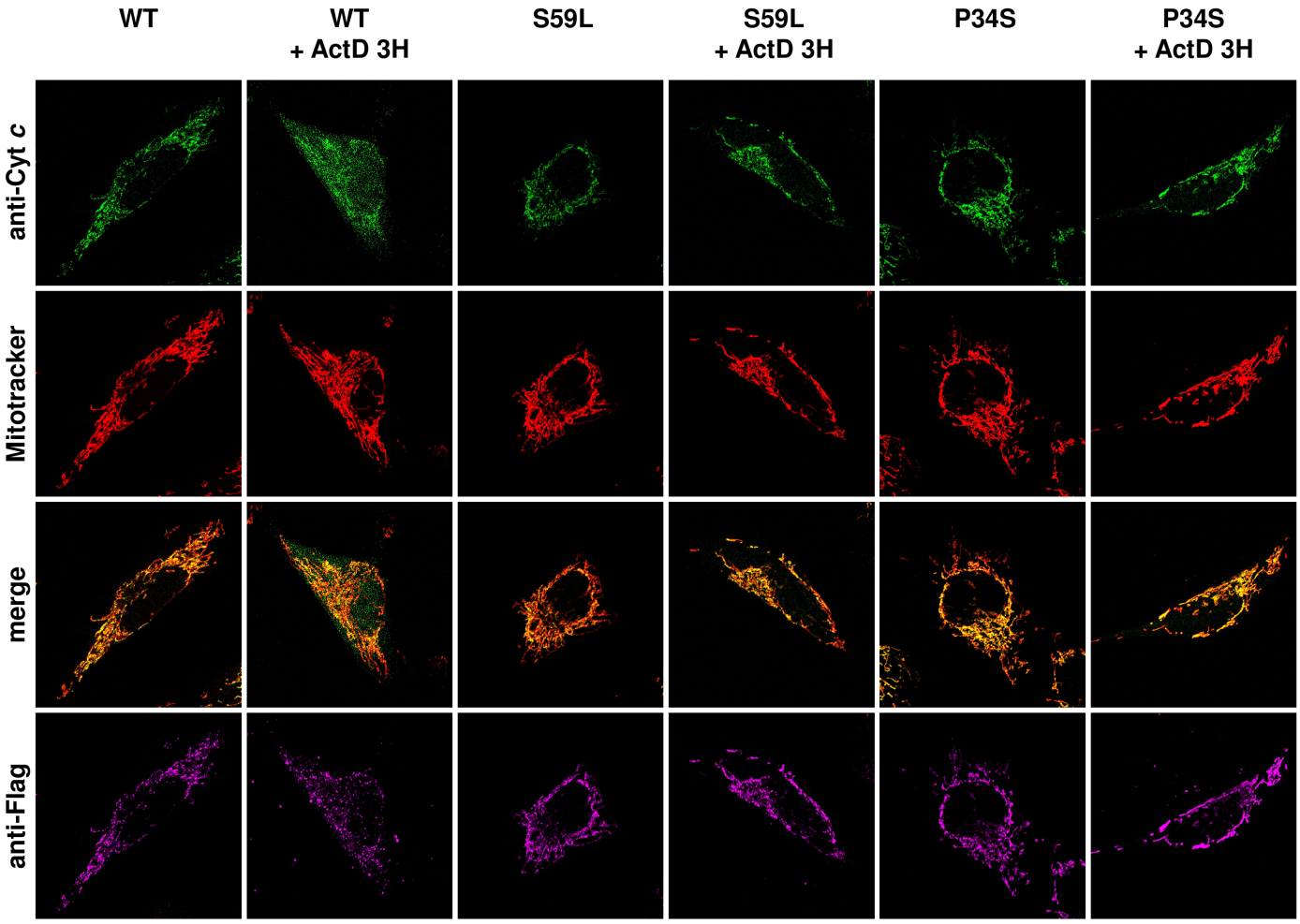
Supplementary figure 5



Supplementary figure 6



Supplementary figure 7



Supplementary figure 8

A

SPECTROPHOTOMETRIC ANALYSIS ON FIBROBLASTS						
GLUCOSE MEDIUM						
Enzymatic activities	**I**	**II**	**III**	**IV**	**V**	**CS**
Control values (nmol/min/mg of proteins)	9.0-27.1	18.5-54.0	57.4-176.2	109.9-350.0	22.0-46.2	74.7-161.1
Patient 2	13.8	22.2	119.0	143.5	38.6	114.7

B

SPECTROPHOTOMETRIC ANALYSIS ON FIBROBLASTS						
GALACTOSE MEDIUM						
Enzymatic activities	**I**	**II**	**III**	**IV**	**V**	**CS**
Control values (nmol/min/mg of proteins)	15.2-19.4	28.2-33.1	88.8-116.4	181.7-315.4	22.7-32.1	124.8-223.0
Patient 2	**9.4**	**20.6**	**85.6**	**146.8**	32.9	198.5

Supplementary table 1

4 Discussion

Les ataxies spinocérébelleuses héréditaires font partie d'un groupe de maladies neurodégénératives et sont hétérogènes tant sur le plan phénotypique que génétique. Elles sont dues à une atteinte du cervelet et se manifestent par des symptômes moteurs tels que des troubles de l'équilibre, de la marche ou des mouvements oculaires. Elles peuvent être transmises selon un mode autosomique dominant ou récessif, et l'évolution est variable. Néanmoins, il reste encore de nombreux cas non expliqués par les gènes connus, suggérant l'implication de nouveaux gènes restant à découvrir.
Des mutations dans des gènes impliqués dans des ataxies cérébelleuses ont déjà été décrits comme pathogènes ou comme facteurs de risque de sclérose latérale amyotrophique. Des expansions polyglutaminiques dans *ATXN2* ont été associées à un risque augmenté de sclérose latérale amyotrophique (50). Le gène *SETX*, qui est responsable d'ataxie avec apraxie oculomotrice 2, est décrit dans une forme juvénile de sclérose latérale amyotrophique (ALS4) (51). Nous n'avons pas retrouvé de mutations dans *CHCHD10* chez nos sujets atteints d'ataxie cérébelleuse. Cependant, notre étude comporte certaines limites, notre cohorte présente un nombre de sujets trop faible, d'origine géographique caucasienne exclusivement. Cependant, le séquençage de patients avec ataxie cérébelleuse doit être répété dans des cohortes plus importantes, avec des origines géographiques différentes afin de limiter les biais liés à l'échantillon.

Le gène *CHCHD10* a été récemment impliqué en pathologie humaine dans un large spectre clinique de pathologies neurodégénératives (18,19,21–24,27,47,52,53). Il a également été montré que l'inactivation de protéines du complexe MICOS entraîne des altérations de la morphologie des crêtes mitochondriales et perturbe le fonctionnement des complexes de la chaine respiratoire (54). Nous avions déjà montré que CHCHD10 est localisée dans l'espace intermembranaire mitochondrial, et plus précisément enrichie au niveau de la jonction des crêtes, et que l'expression d'allèles mutés entrainait une désorganisation des crêtes mitochondriales (18). Nous confirmons ces résultats en montrant que CHCHD10 fait partie du complexe MICOS.

Il a déjà été décrit que le nombre de nucléoïdes diminue, lors d'une inactivation de la protéine de fission DRP1, avec une augmentation de leur taille et une désorganisation des crêtes (55). Nous montrons dans ce travail, que les mutations pathogènes dans

CHCHD10 entraînent une diminution du nombre de nucléoïdes, sans pour autant d'augmentation de leur taille. Les nucléoïdes permettent de protéger l'ADN mitochondrial, et contiennent des protéines impliquées dans son métabolisme, y compris sa réparation. Nous avons montré que la réparation de l'ADN mitochondrial était altérée dans les fibroblastes de patients, vraisemblablement suite à la perte d'une partie de l'ADN mitochondrial dans la matrice.
L'autophagie mitochondriale est un processus qui permet d'éliminer les mitochondries endommagées de façon sélective, pour garder une certaine qualité des mitochondries (56). Notre analyse n'a pas montré d'altération de la mitophagie dans les fibroblastes de patients. Il a déjà été montré qu'une perturbation de l'autophagie était associée à la sclérose latérale amyotrophique et à la démence frontotemporale, et induisait une accumulation de TDP-43, par défaut de clairance de la forme ubiquitinylée (57). Des études sur d'autres cellules telles que les neurones exprimant des allèles *CHCHD10* mutés seraient nécessaires pour confirmer nos résultats.

Les crêtes mitochondriales renferment le cytochrome *c*. Son relargage marque le début de la réaction en cascade des caspases qui entraine l'apoptose. Nous avons donc étudié l'impact des mutations *CHCHD10* sur le relargage du cytochrome *c*. De manière surprenante, nous avons observé une diminution significative de l'apoptose dans les cellules HeLa exprimant les mutations p.Pro34Ser et p.Ser59Leu, et dans les fibroblastes de nos patients portant la mutation p.Ser59Leu. Alors qu'une augmentation de l'apoptose au niveau des cellules nerveuses est généralement avancée dans les maladies neurodégénératives pour expliquer la mort neuronale, nous avons observé un effet protecteur contre l'apoptose et un retard au relargage du cytochrome *c*. On peut donc imaginer que des mécanismes beaucoup plus complexes conduisent à la perte neuronale.
D'autre part, la mort cellulaire programmée est cruciale pour le bon développement et la bonne maturation du système nerveux (58). Nous pouvons nous demander si une diminution ou une dérégulation de ce processus pourrait-être critique pour organiser la sélection de cellules nerveuses de bonne qualité ainsi que pour le contrôle de leur nombre et de la mise en place de leurs connections. De nouvelles études seront nécessaires pour mieux comprendre pourquoi les neurones dégénèrent malgré cette diminution de l'apoptose. Il serait particulièrement intéressant d'étudier ces

mécanismes sur des cellules neuronales à partir de modèles murins ou de cellules iPS, cellules pluripotentes induites à partir de patients porteurs de mutations *CHCHD10*.

5 Conclusion

Ce travail est le premier à montrer le lien entre des mutations dans un gène codant pour un composant du complexe MICOS causant une pathologie humaine. Ces mutations conduisent à une désorganisation du complexe, une désorganisation du réseau mitochondrial, une déficience de la chaine respiratoire, une désorganisation des nucléoïdes avec une altération de la réparation et une inhibition de l'apoptose. Les multiples phénotypes de pathologies neurodégénératives posent de nouvelles questions sur des nouvelles voies cellulaires complexes dont la mitochondrie serait un élément clé. De nouvelles études sont nécessaires pour mieux comprendre toutes les voies impliquées, ce qui les relie à la mitochondrie, et conduit à des pathologies neurodégénératives, afin d'envisager à terme une solution thérapeutique.

6 Bibliographie

1. Wanrooij S, Falkenberg M. The human mitochondrial replication fork in health and disease. Biochim Biophys Acta BBA - Bioenerg. 2010 Aug;1797(8):1378–88.

2. Korhonen JA, Pham XH, Pellegrini M, Falkenberg M. Reconstitution of a minimal mtDNA replisome in vitro. EMBO J. 2004;23(12):2423–9.

3. Cohen BH, Naviaux RK. The clinical diagnosis of POLG disease and other mitochondrial DNA depletion disorders. Methods San Diego Calif. 2010 Aug;51(4):364–73.

4. Wong L-JC, Naviaux RK, Brunetti-Pierri N, Zhang Q, Schmitt ES, Truong C, et al. Molecular and clinical genetics of mitochondrial diseases due to POLG mutations. Hum Mutat. 2008 Sep;29(9):E150–72.

5. Hakonen AH, Heiskanen S, Juvonen V, Lappalainen I, Luoma PT, Rantamaki M, et al. Mitochondrial DNA polymerase W748S mutation: a common cause of autosomal recessive ataxia with ancient European origin. Am J Hum Genet. 2005 Sep;77(3):430–41.

6. Van Goethem G, Dermaut B, Löfgren A, Martin JJ, Van Broeckhoven C. Mutation of POLG is associated with progressive external ophthalmoplegia characterized by mtDNA deletions. Nat Genet. 2001 Jul;28(3):211–2.

7. Spelbrink JN, Li FY, Tiranti V, Nikali K, Yuan QP, Tariq M, et al. Human mitochondrial DNA deletions associated with mutations in the gene encoding Twinkle, a phage T7 gene 4-like protein localized in mitochondria. Nat Genet. 2001 Jul;28(3):223–31.

8. Sarzi E, Goffart S, Serre V, Chrétien D, Slama A, Munnich A, et al. Twinkle helicase *(PEO1)* gene mutation causes mitochondrial DNA depletion. Ann Neurol. 2007 Dec;62(6):579–87.

9. Hirano M, Martí R, Spinazzola A, Nishino I, Nishigaki Y. Thymidine phosphorylase deficiency causes MNGIE: an autosomal recessive mitochondrial disorder. Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids. 2004 Oct;23(8-9):1217–25.

10. Saada A, Shaag A, Mandel H, Nevo Y, Eriksson S, Elpeleg O. Mutant mitochondrial thymidine kinase in mitochondrial DNA depletion myopathy. Nat Genet. 2001 Nov;29(3):342–4.

11. Tyynismaa H, Sun R, Ahola-Erkkilä S, Almusa H, Pöyhönen R, Korpela M, et al. Thymidine kinase 2 mutations in autosomal recessive progressive external ophthalmoplegia with multiple mitochondrial DNA deletions. Hum Mol Genet. 2012 Jan 1;21(1):66–75.

12. Mandel H, Szargel R, Labay V, Elpeleg O, Saada A, Shalata A, et al. The deoxyguanosine kinase gene is mutated in individuals with depleted hepatocerebral mitochondrial DNA. Nat Genet. 2001 Nov;29(3):337–41.

13. Alexander C, Votruba M, Pesch UE, Thiselton DL, Mayer S, Moore A, et al. OPA1, encoding a dynamin-related GTPase, is mutated in autosomal dominant optic atrophy linked to chromosome 3q28. Nat Genet. 2000 Oct;26(2):211–5.

14. Carelli V, Musumeci O, Caporali L, Zanna C, La Morgia C, Del Dotto V, et al. Syndromic parkinsonism and dementia associated with *OPA 1* missense mutations: *OPA1* Mutations. Ann Neurol. 2015 Jul;78(1):21–38.

15. Züchner S, Mersiyanova IV, Muglia M, Bissar-Tadmouri N, Rochelle J, Dadali EL, et al. Mutations in the mitochondrial GTPase mitofusin 2 cause Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 2A. Nat Genet. 2004 May;36(5):449–51.

16. Rouzier C, Bannwarth S, Chaussenot A, Chevrollier A, Verschueren A, Bonello-Palot N, et al. The MFN2 gene is responsible for mitochondrial DNA instability and optic atrophy "plus" phenotype. Brain. 2012 Jan 1;135(1):23–34.

17. Waterham HR, Koster J, van Roermund CW, Mooyer PA, Wanders RJ, Leonard JV. A lethal defect of mitochondrial and peroxisomal fission. N Engl J Med. 2007;356(17):1736–41.

18. Bannwarth S, Ait-El-Mkadem S, Chaussenot A, Genin EC, Lacas-Gervais S, Fragaki K, et al. A mitochondrial origin for frontotemporal dementia and amyotrophic lateral sclerosis through CHCHD10 involvement. Brain. 2014 Aug 1;137(8):2329–45.

19. Chaussenot A, Le Ber I, Ait-El-Mkadem S, Camuzat A, de Septenville A, Bannwarth S, et al. Screening of CHCHD10 in a French cohort confirms the involvement of this gene in frontotemporal dementia with amyotrophic lateral sclerosis patients. Neurobiol Aging. 2014 Jul 24;

20. Chiò A, Mora G, Sabatelli M, Caponnetto C, Traynor BJ, Johnson JO, et al. CHCH10 mutations in an Italian cohort of familial and sporadic amyotrophic lateral sclerosis patients. Neurobiol Aging. 2015;36(4):1767–e3.

21. Johnson JO, Glynn SM, Gibbs JR, Nalls MA, Sabatelli M, Restagno G, et al. Mutations in the CHCHD10 gene are a common cause of familial amyotrophic lateral sclerosis. Brain. 2014 Dec 1;137(12):e311–e311.

22. Kurzwelly D, Kruger S, Biskup S, Heneka MT. A distinct clinical phenotype in a German kindred with motor neuron disease carrying a CHCHD10 mutation. Brain [Internet]. 2015 Feb 12 [cited 2015 Apr 2]; Available from: http://www.brain.oxfordjournals.org/cgi/doi/10.1093/brain/awv014

23. Muller K, Andersen PM, Hubers A, Marroquin N, Volk AE, Danzer KM, et al. Two novel mutations in conserved codons indicate that CHCHD10 is a gene associated with motor neuron disease. Brain. 2014 Dec 1;137(12):e309–e309.

24. Ronchi D, Riboldi G, Del Bo R, Ticozzi N, Scarlato M, Galimberti D, et al. CHCHD10 mutations in Italian patients with sporadic amyotrophic lateral sclerosis. Brain [Internet]. 2015 Jan 8 [cited 2015 Feb 2]; Available from: http://www.brain.oxfordjournals.org/cgi/doi/10.1093/brain/awu384

25. Cozzolino M, Rossi S, Mirra A, CarrÃ¬ MT. Mitochondrial dynamism and the pathogenesis of Amyotrophic Lateral Sclerosis. Front Cell Neurosci [Internet]. 2015 Feb 10

[cited 2015 Aug 13];9. Available from:
http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fncel.2015.00031/abstract

26. Penttilä S, Jokela M, Bouquin H, Saukkonen AM, Toivanen J, Udd B. Late onset spinal motor neuronopathy is caused by mutation in *CHCHD 10*: *CHCHD10* Mutation and SMAJ. Ann Neurol. 2015 Jan;77(1):163–72.

27. Auranen M, Ylikallio E, Shcherbii M, Paetau A, Kiuru-Enari S, Toppila JP, et al. CHCHD10 variant p.(Gly66Val) causes axonal Charcot-Marie-Tooth disease. Neurol Genet. 2015;1(1):e1.

28. Hirano M, Angelini C, Montagna P, Hays AP, Tanji K, Mitsumoto H, et al. Amyotrophic lateral sclerosis with ragged-red fibers. Arch Neurol. 2008 Mar;65(3):403–6.

29. Crugnola V, Lamperti C, Lucchini V, Ronchi D, Peverelli L, Prelle A, et al. Mitochondrial respiratory chain dysfunction in muscle from patients with amyotrophic lateral sclerosis. Arch Neurol. 2010 Jul;67(7):849–54.

30. Charcot J, Joffroy A. Deux cas d'atrophie musculaire progressive avec lesions de la substance grise et des faisceaux antero-lateraux de la moelle epiniere [French]. Arch Physiol Neurol Pathol2,744. 1869;

31. Rosen DR, Siddique T, Patterson D, Figlewicz DA, Sapp P, Hentati A, et al. Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. Nature. 1993 Mar 4;362(6415):59–62.

32. Renton AE, Chiò A, Traynor BJ. State of play in amyotrophic lateral sclerosis genetics. Nat Neurosci. 2013 Dec 26;17(1):17–23.

33. DeJesus-Hernandez M, Mackenzie IR, Boeve BF, Boxer AL, Baker M, Rutherford NJ, et al. Expanded GGGGCC Hexanucleotide Repeat in Noncoding Region of C9ORF72 Causes Chromosome 9p-Linked FTD and ALS. Neuron. 2011 Oct;72(2):245–56.

34. Farg MA, Sundaramoorthy V, Sultana JM, Yang S, Atkinson RAK, Levina V, et al. C9ORF72, implicated in amytrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia, regulates endosomal trafficking. Hum Mol Genet. 2014 Jul 1;23(13):3579–95.

35. Sabatelli M, Conforti FL, Zollino M, Mora G, Monsurrò MR, Volanti P, et al. C9ORF72 hexanucleotide repeat expansions in the Italian sporadic ALS population. Neurobiol Aging. 2012 Aug;33(8):1848.e15–1848.e20.

36. Majounie E, Renton AE, Mok K, Dopper EG, Waite A, Rollinson S, et al. Frequency of the C9orf72 hexanucleotide repeat expansion in patients with amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia: a cross-sectional study. Lancet Neurol. 2012;11(4):323–30.

37. Gitcho MA, Baloh RH, Chakraverty S, Mayo K, Norton JB, Levitch D, et al. *TDP-43* A315T mutation in familial motor neuron disease. Ann Neurol. 2008 Apr;63(4):535–8.

38. Kabashi E, Valdmanis PN, Dion P, Spiegelman D, McConkey BJ, Velde CV, et al. TARDBP mutations in individuals with sporadic and familial amyotrophic lateral sclerosis.

Nat Genet. 2008 May;40(5):572–4.

39. Neumann M, Sampathu DM, Kwong LK, Truax AC, Micsenyi MC, Chou TT, et al. Ubiquitinated TDP-43 in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. Science. 2006;314(5796):130–3.

40. Guerreiro R, Brás J, Hardy J. SnapShot: Genetics of ALS and FTD. Cell. 2015 Feb;160(4):798–798.e1.

41. Pasanen P, Myllykangas L, Pöyhönen M, Kiuru-Enari S, Tienari PJ, Laaksovirta H, et al. Intrafamilial clinical variability in individuals carrying the *CHCHD10* mutation Gly66Val. Acta Neurol Scand. 2015 Jul;n/a – n/a.

42. Dols-Icardo O, Nebot I, Gorostidi A, Ortega-Cubero S, Hernández I, Rojas-García R, et al. Analysis of the *CHCHD10* gene in patients with frontotemporal dementia and amyotrophic lateral sclerosis from Spain. Brain. 2015 Jul 7;awv175.

43. Dobson-Stone C, Shaw AD, Hallupp M, Bartley L, McCann H, Brooks WS, et al. Is CHCHD10 Pro34Ser pathogenic for frontotemporal dementia and amyotrophic lateral sclerosis? Brain [Internet]. 2015 May 7 [cited 2015 Aug 18]; Available from: http://www.brain.oxfordjournals.org/cgi/doi/10.1093/brain/awv115

44. Rascovsky K, Hodges JR, Knopman D, Mendez MF, Kramer JH, Neuhaus J, et al. Sensitivity of revised diagnostic criteria for the behavioural variant of frontotemporal dementia. Brain. 2011 Sep 1;134(9):2456–77.

45. Penttilä S, Jokela M, Bouquin H, Saukkonen AM, Toivanen J, Udd B. Late onset spinal motor neuronopathy is caused by mutation in *CHCHD 10*: *CHCHD10* Mutation and SMAJ. Ann Neurol. 2015 Jan;77(1):163–72.

46. Jokela M, Penttilä S, Huovinen S, Hackman P, Saukkonen AM, Toivanen J, et al. Late-onset lower motor neuronopathy: a new autosomal dominant disorder. Neurology. 2011 Jul 26;77(4):334–40.

47. Ajroud-Driss S, Fecto F, Ajroud K, Lalani I, Calvo SE, Mootha VK, et al. Mutation in the novel nuclear-encoded mitochondrial protein CHCHD10 in a family with autosomal dominant mitochondrial myopathy. neurogenetics. 2015 Jan;16(1):1–9.

48. Plutino M, Chaussenot A, Ait-El-Mkadem S, Bannwarth S, Genin EC, Rouzier C, et al. Letter to the Editor on a paper by Hsiao C-T, Tsai P-C, Liao Y-C, Lee Y-C, Soong B-W. C9ORF72 repeat expansion is not a significant cause of late-onset cerebellar ataxia syndrome. J Neurol Sci 2014;347:322–324. J Neurol Sci [Internet]. 2015 Feb [cited 2015 Feb 22]; Available from: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022510X15000921

49. Pfanner N, van der Laan M, Amati P, Capaldi RA, Caudy AA, Chacinska A, et al. Uniform nomenclature for the mitochondrial contact site and cristae organizing system. J Cell Biol. 2014 Mar 31;204(7):1083–6.

50. Elden AC, Kim H-J, Hart MP, Chen-Plotkin AS, Johnson BS, Fang X, et al. Ataxin-2 intermediate-length polyglutamine expansions are associated with increased risk for ALS.

Nature. 2010 Aug 26;466(7310):1069–75.

51. Chen Y-Z, Bennett CL, Huynh HM, Blair IP, Puls I, Irobi J, et al. DNA/RNA helicase gene mutations in a form of juvenile amyotrophic lateral sclerosis (ALS4). Am J Hum Genet. 2004 Jun;74(6):1128–35.

52. Chiò A, Mora G, Sabatelli M, Caponnetto C, Traynor BJ, Johnson JO, et al. CHCH10 mutations in an Italian cohort of familial and sporadic amyotrophic lateral sclerosis patients. Neurobiol Aging. 2015;36(4):1767–e3.

53. Zhang M, Xi Z, Zinman L, Bruni AC, Maletta RG, Curcio SAM, et al. Mutation analysis of CHCHD10 in different neurodegenerative diseases. Brain [Internet]. 2015 Mar 31 [cited 2015 Apr 11]; Available from: http://www.brain.oxfordjournals.org/cgi/doi/10.1093/brain/awv082

54. Cogliati S, Frezza C, Soriano ME, Varanita T, Quintana-Cabrera R, Corrado M, et al. Mitochondrial cristae shape determines respiratory chain supercomplexes assembly and respiratory efficiency. Cell. 2013;155(1):160–71.

55. Ban-Ishihara R, Ishihara T, Sasaki N, Mihara K, Ishihara N. Dynamics of nucleoid structure regulated by mitochondrial fission contributes to cristae reformation and release of cytochrome c. Proc Natl Acad Sci. 2013 Jul 16;110(29):11863–8.

56. Youle RJ, Narendra DP. Mechanisms of mitophagy. Nat Rev Mol Cell Biol. 2011;12(1):9–14.

57. Barmada SJ, Serio A, Arjun A, Bilican B, Daub A, Ando DM, et al. Autophagy induction enhances TDP43 turnover and survival in neuronal ALS models. Nat Chem Biol. 2014 Jun 29;10(8):677–85.

58. Miura M. Apoptotic and non-apoptotic caspase functions in neural development. Neurochem Res. 2011 Jul;36(7):1253–60.

Résumé

CHCHD10 a récemment été impliqué dans un large spectre clinique de pathologies neurodégénératives dont la sclérose latérale amyotrophique, la démence frontotemporale, l'amyotrophie spinale de type Jokela et la maladie de Charcot-Marie-Tooth de type 2, ainsi que dans une myopathie mitochondriale avec instabilité de l'ADN mitochondrial. Ce gène code pour une protéine mitochondriale située dans l'espace inter membranaire, enrichie à la jonction des crêtes mitochondriales, dont la fonction était jusqu'alors inconnue.

Ce travail avait pour objectif (i) de déterminer si le spectre clinique des pathologies associées au gène *CHCHD10* concerne aussi les ataxies cérébelleuses et, (ii) de caractériser le rôle de la protéine CHCHD10 pour mieux comprendre comment un dysfonctionnement mitochondrial peut être à l'origine de la mort des neurones moteurs. L'analyse de *CHCHD10* dans une cohorte de 78 patients présentant une ataxie cérébelleuse de formes familiales ou sporadiques n'a permis de détecter aucune mutation pathogène suggérant que *CHCHD10* n'est pas un gène majeur d'ataxie. Il faudra néanmoins continuer à tester ce gène dans de plus grandes cohortes d'ataxie cérébelleuse, présentant des origines géographiques différentes, afin d'évaluer l'implication réelle de *CHCHD10* dans cette pathologie.

L'étude fonctionnelle de *CHCHD10* a permis de montrer que la mutation p.Ser59Leu entraine une désorganisation du complexe MICOS (**MI**tochondrial contact site and **C**ristae **O**rganizing **S**ystem), une déstructuration des crêtes mitochondriales induisant un déficit de la chaîne respiratoire mitochondriale, une diminution de taille des nucléoïdes, un défaut de réparation de l'ADN mitochondrial et une inhibition de l'apoptose.

Ce travail est le premier à montrer le lien entre des mutations dans un gène codant pour un composant du complexe MICOS et une pathologie humaine. Les multiples phénotypes de pathologies neurodégénératives posent des questions sur de nouvelles voies cellulaires complexes dont la mitochondrie serait un élément clé. De nouvelles études sont nécessaires pour mieux comprendre toutes les voies impliquées, ce qui les relie à la mitochondrie et conduit à des pathologies neurodégénératives afin d'envisager à terme une solution thérapeutique.